

Année Scolaire 1960-1961

---

**CONTRIBUTION  
A L'ÉTUDE D'UN DOSAGE NORMALISÉ  
DE LA PAPAÏNE**

---

**THÈSE**

*pour l'obtention du grade  
de  
Doctorat d'Etat en Pharmacie  
présentée et soutenue le 22 Avril 1961*

par

**Y. HOLTZHAUER**

Pharmacien de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Nantes  
Assistante

Chef de Travaux délégué de Pharmacie Galénique en cette Faculté

---

Jury

M. le Professeur JANOT

*Président*

M. le Professeur DOMANGE

*Examineurs*

M. le Professeur LE HIR

---



UNIVERSITÉ DE PARIS  
BIBLIOTHÈQUE DE MÉDECINE  
104 P. 104

1875-1876



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Année Solaire 1960-1961

---

**CONTRIBUTION  
A L'ÉTUDE D'UN DOSAGE NORMALISÉ  
DE LA PAPAÏNE**

---

**THÈSE**

*pour l'obtention du grade  
de*

*Doctorat d'Etat en Pharmacie  
présentée et soutenue le 22 Avril 1961*

par

**Y. HOLTZHAUER**

Pharmacien de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Nantes

Assistante

Chef de Travaux délégué de Pharmacie Galénique en cette Faculté

---

Jury

M. le Professeur JANOT

*Président*

M. le Professeur DOMANGE

*Examineurs*

M. le Professeur LE HIR





## PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

## ADMINISTRATION

|                    |                             |   |   |   |   |
|--------------------|-----------------------------|---|---|---|---|
| MM. G. VALETTE     | Doyen,                      | ⌘ | , | Q | I |
| M-M. JANOT         | Assesseur                   | ⌘ | , | Q | I |
| G. CUVIER          | Secrétaire Général          | ⌘ | , | Q | I |
| L. JEANDEL         | Secrétaire Général-Adjoint, |   |   | Q | I |
| Mme S. CERTAIN     | Secrétaire                  | Q | I |   |   |
| Mme M.L. ESPINASSE | Secrétaire                  | Q | I |   |   |

## DOYEN HONORAIRE

|               |   |   |   |   |    |                       |
|---------------|---|---|---|---|----|-----------------------|
| M. René FABRE | C | ⌘ | , | Q | C, | Membre de l'Institut. |
|---------------|---|---|---|---|----|-----------------------|

## PROFESSEURS HONORAIRES

|                |   |   |   |   |     |                      |   |   |   |    |     |
|----------------|---|---|---|---|-----|----------------------|---|---|---|----|-----|
| MM. René FABRE | C | ⌘ | , | Q | C,  | Membre de l'Institut |   |   |   |    |     |
| DELEPINE       | C | ⌘ | , | Q | I   | Membre de l'Institut |   |   |   |    |     |
| LAUNOY         | O | ⌘ | , | Q | I ; | FLEURY               | O | ⌘ | , | Q  | I ; |
|                |   |   |   |   |     | MASCHE               | O | ⌘ | , | Q  | C   |
| PICON          | O | ⌘ | , | Q | I ; | BEDEL                | ⌘ | , | Q | I. |     |

## PROFESSEURS

|                |   |   |   |   |                                                                         |
|----------------|---|---|---|---|-------------------------------------------------------------------------|
| MM. M-M. JANOT | ⌘ | , | Q | I | - Pharmacie Galénique (T.)                                              |
| G. VALETTE     | ⌘ | , | Q | I | - Pharmacodynamie (T.)                                                  |
| R. PARIS       | ⌘ | , | Q | I | - Histoire naturelle des médicaments<br>simples d'origine végétale (T.) |
| M. GUILLOT     | ⌘ | , | Q | I | - Physique (T.)                                                         |
| J. GAUTIER     | ⌘ | , | Q | I | - Chimie organique (T.)                                                 |
| Mlle S. LAMBIN | ⌘ | , | Q | I | - Microbiologie (T.)                                                    |
| MM. Y. RAOUL   | ⌘ | , | Q | I | - Zoologie appliquée (T.)                                               |
| J. COURTOIS    | ⌘ | , | Q | I | - Chimie biologique (T.)                                                |
| L. DOMANGE     | ⌘ | , | Q | I | - Chimie Minérale (T.)                                                  |

|     |                 |     |     |     |                                                                          |
|-----|-----------------|-----|-----|-----|--------------------------------------------------------------------------|
| MM. | P. CRETE        | 零   | ,   | Q I | - Botanique (T.)                                                         |
|     | R. TRUHAUT      | O 零 | ,   | Q I | - Toxicologie et Hygiène industrielle (T.)                               |
|     | A. MORETTE      | 零   | ,   | Q I | - Hydrologie (T.)                                                        |
|     | R. CAVIER       |     |     | Q I | - Parasitologie (T.)                                                     |
|     | A. QUEVAUVILLER |     |     | Q I | - Hygiène (T.)                                                           |
|     | R. MOREAU       | 零   | ,   | Q I | - Pharmacie chimique (T.)                                                |
| MM. | J. GUY          |     |     | Q I | - Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T. P.) |
|     | A. GERMAN       |     | Q I |     | - Virologie et sérologie                                                 |
|     | M. PIETTE       |     | Q I |     | - Biologie sanguine (T.P.)                                               |
|     | P. MALANGEAU    |     | Q A |     | - Chimie Analytique (T.)                                                 |
|     | M. GIRARD       |     | Q I |     | - Chimie appliquée à l'expertise (T.)                                    |
|     | G. DILLEMANN    |     |     |     | - Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.)              |
|     | G. DEYSSON      |     | Q I |     | - Professeur sans chaire                                                 |
|     | J. FLAHAUT      |     |     |     | " "                                                                      |
|     | A. LE HIR       |     |     |     | " "                                                                      |
|     | J. RENAULT      |     | Q A |     | " "                                                                      |

#### MAITRES DE CONFERENCES

|     |              |  |     |  |                                                                |
|-----|--------------|--|-----|--|----------------------------------------------------------------|
| MM. | P. LARUELLE  |  |     |  | - Physique                                                     |
|     | G. LE MOAN   |  |     |  | - Toxicologie                                                  |
|     | P. ROSSIGNOL |  |     |  | - Pharmacodynamie                                              |
|     | H. RENAULT   |  | Q A |  | - Pharmacie chimique                                           |
|     | G. PAOLETTI  |  |     |  | - Radioisotopes - Applications à la Biologie et à la Pharmacie |
|     | A. MANGEOT   |  | Q A |  | - Chimie analytique                                            |
|     | P. DELAVEAU  |  |     |  | - Biologie végétale                                            |
|     | C. BOUDENE   |  |     |  | - Toxicologie et Hygiène industrielles                         |
|     | A. DESVIGNES |  | Q A |  | - Microbiologie                                                |
|     | F. PERCHERON |  |     |  | - Biochimie                                                    |
|     | J. N. SAVEL  |  |     |  | - Sciences Naturelles                                          |

MM. P. REYNAUD

- Sciences Physico-chimiques

J. BORY

- Sciences Naturelles.

## CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. N.....

- Sérologie

P. CORRIEZ

Q I

- Physique

J. DUCHENNE

- Microbiologie

J. GARDENT

- Chimie analytique - 1<sup>ère</sup> année -

P. GESTEAU

, Q I

- Physique biologique

J. HARISPE

Q I

- Chimie générale et pharmaceutiques

J. HENRY

- Chimie (4<sup>ème</sup> année)

M. LECLERC

Q A

- Chimie biologique

R. LELUC

- Microbiologie

M. LEMONNIER

- Chimie analytique (2<sup>ème</sup> & 3<sup>ème</sup> années)

Mlle S. LONGUEVALLE

Q I

- Service des examens de chimie

MM. P. PELLERIN

- Chimie analytique (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> années)

R. POTTIER

Q A

- Pharmacie galénique industrielle

P. POULAIN

- Hématologie

Mme M. ROBERT

- Sérologie

Mlle A. ROLLEN

, Q A

- Biologie végétale

M. N. ....

- Parasitologie

## INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. A. CAVE

- Chef de travaux de pharmacotechnie galénique

Mlle H. MORIN

Q A

- Chef de travaux de pharmacodynamie

M. ROBBA

- Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

## BIBLIOTHEQUE

M. GARNIER

, Q I

- Conservateur, chargé de la Direction

Mlle L. LAUD

Q I

- Conservateur

Mmes DESGRIPPES

Q A

- Bibliothécaire

KREHMER

Q A

- Bibliothécaire.

A MES PARENTS

qui ont su diriger mes études et  
m'ont donné l'exemple de la té-  
nacité et du courage.

*En témoignage de profonde affection.*

A MA FAMILLE

A MES AMIS

*A Monsieur le Professeur M.M. JANOT*  
*Titulaire de la Chaire de Pharmacie Galénique de*  
*la Faculté de Pharmacie de Paris*  
*Membre des Académies de Médecine et de Pharmacie*

Qui a bien voulu nous confier ce travail,  
a dirigé nos recherches et nous a fait le  
grand honneur d'accepter la présidence  
de cette thèse.

*En témoignage de notre respectueuse gratitude et de*  
*notre entier dévouement.*

*A Monsieur le Professeur C. Y. LE POLLÈS*

*Titulaire de la Chaire de Pharmacie Galénique de la  
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Nantes  
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie*

Qui a bien voulu nous choisir comme  
assistante, nous a si aimablement ac-  
cueilli dans son laboratoire, nous a  
confié la direction des Travaux Prati-  
ques, et nous a dispensé ses précieux  
conseils.

*Qu'il trouve ici l'expression de notre bien vive et  
respectueuse gratitude pour l'intérêt qu'il n'a cessé de  
nous témoigner.*

*A Monsieur le Professeur L. DOMANGE*

*Professeur de Chimie Minérale à la Faculté de Pharmacie de Paris,  
Directeur du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments,  
Membre de l'Académie de Pharmacie.*

Qui a bien voulu accepter de faire partie  
de notre jury de thèse.

*En témoignage de sincère reconnaissance.*

*A Monsieur le Professeur A. LE HIR*

*Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris.*

Qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

*En témoignage de notre vive gratitude.*

*A Monsieur le Professeur Y. BOQUIEN*

*Doyen de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Nantes*

*En témoignage de respectueuse gratitude*

*A mes Maîtres de la Faculté Mixte de Médecine et*

*de Pharmacie de Nantes*

*Monsieur le Professeur R. MONNET*

*Professeur de Matière Médicale et de Pharmacologie*

*Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie*

*Qui nous prodigua ses critiques avisées  
et nous témoigna un intérêt constant tout  
au long de ce travail,*

*En témoignage de notre sincère reconnaissance.*

*Monsieur le Professeur P.E. LOSSOUARN*

*Titulaire de la Chaire de Chimie Pharmaceutique*

*Monsieur le Professeur Y. STEPHAN*

*Titulaire de la Chaire de Pharmacodynamie*

*et de Chimie Biologique Pharmaceutique*

*Pour le précieux enseignement qu'ils nous ont donné, en  
témoignage de notre gratitude.*

*Monsieur le Professeur M. DALLONGEVILLE*

*Titulaire de la Chaire de Physique*

**En témoignage de respectueuse gratitude et de  
nos sincères remerciements.**

*Monsieur le Professeur J. PLOQUIN*

*Titulaire de la Chaire de Pharmacie Chimique*

**Qui nous a tant aidée, guidée et encouragée dans la  
réalisation de cette thèse .**

*Monsieur A. FOUCAUD*

*Maître de Conférence Agrégé*

*Monsieur le Professeur P. JARDIN*

*des Facultés de Droit et des Lettres d'Angers*

*Chargé du Cours de Déontologie et de Législation en notre Faculté*

*Docteur Ch. ROUSSEAU*

*Chargé d'assurer le service de  
Zoologie et de Parasitologie*

*Madame J. POISBEAU*

*Docteur Y. BRUNEAU*

*Monsieur M. DROUARD*

**Qui ont dirigé nos Travaux Pratiques .**

**En remerciement de leur enseignement .**

A tous ceux qui ont grandement facilité notre travail  
par l'atmosphère de cordialité et l'esprit d'équipe que  
nous avons toujours trouvés à la Faculté de Nantes, à  
tous ceux qui nous ont aidée et encouragée de leur  
sympathie et de leur amitié ,

tout particulièrement à nos condisciples :

Monsieur H. CORNETEAU

Assistant

Monsieur G. CORNU

Assistant

Mademoiselle C. NEAU

Assistante

*Nous tenons à exprimer notre amicale gratitude ,*

A nos Confrères de la Promotion 1957 .



Photographie du Docteur Y. BRUNEAU

fig. I Fleur de papayer mâle

( grossie 10 fois )

D'après nature



Photographie du Docteur Y. BRUNEAU

fig. 2 Fleur de papayer femelle

(grossie 10 fois)

D'après DESCOURTILZ M. E. (28)



## P L A N

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION .....                                                         | 3  |
| CHAPITRE I                                                                 |    |
| <i>GENERALITES</i> .....                                                   | 6  |
| § I Origine .....                                                          | 10 |
| § II Différentes formes commerciales .....                                 | 14 |
| § III Constitution des papaines .....                                      | 15 |
| § IV Usages de la papaine .....                                            | 24 |
| § V Nécessité d'un dosage précis et reproductible<br>des papaines .....    | 30 |
| § VI Rappel de la notion de titre des ferments pro-<br>téolytiques .....   | 31 |
| § VII Mode d'action et facteurs d'activité de la papaine ..                | 32 |
| CHAPITRE II                                                                |    |
| <i>ETUDE DES DIFFERENTES METHODES<br/>    DE DOSAGE DES PAPAINES</i> ..... | 41 |
| § I Etude des substrats .....                                              | 42 |
| A) Substrats naturels .....                                                | 42 |
| B) Substrats synthétiques .....                                            | 46 |
| § II Etude des activateurs .....                                           | 46 |
| § III Tests de fin de réaction .....                                       | 46 |
| A) Substrat soluble .....                                                  | 47 |
| B) Substrat insoluble .....                                                | 50 |
| § IV Conclusion .....                                                      | 55 |

## CHAPITRE III

TRAVAUX PERSONNELS

## MATÉRIEL ET RÉACTIFS UTILISÉS ..... 56

§ I Dosage du Codex 1949 ..... 59

§ II Appareillage utilisé ..... 59

§ III Réactifs utilisés ..... 79

A) Fibrine de porc desséchée ..... 79

B) Suc de papayer, papaïne,  
préparations papaïniques ..... 85

C) Pesée de la papaïne et de la fibrine .... 86

D) Eau ..... 91

## CHAPITRE IV

## ÉTUDE DE LA RÉACTION :

## SUBSTRAT - PAPAÏNE .... 93

A) FIBRINE ..... 94

§ I Étude cinétique ..... 94

§ II Étude d'action de masse ..... 104

B) FIBRINE + ACTIVATEUR ..... 113

§ I Étude cinétique ..... 115

§ II Étude d'action de masse ..... 117

C) CASEINE ..... 120

§ I Étude cinétique ..... 121

§ II Étude d'action de masse ..... 123

## CHAPITRE V

Définition d'un titre ..... 128

Méthode de dosage proposée ..... 131

Quelques titres des papaïnes étudiées ..... 133

CONCLUSION ..... 136

BIBLIOGRAPHIE ..... 138

## Chapitre I

---

### GENERALITES

---



Photographie du Docteur P<sup>b</sup>, M. CHASSAIN

fig3 Papayer mâle

( Serres du Grand Blottereau à Nantes )



Photographie du Docteur P.<sup>A</sup>. M. CHASSAIN

fig.4 Feuille de papayer

( Serres du Grand Blottereau à Nantes )



Photographie du Docteur P.<sup>n</sup> M. CHASSAIN

fig.5 Fleurs de papayer mâle

( Serres du Grand Blottereau à Nantes )

## I - GENERALITES

---

**I - Origine :** De nombreux produits, très différents dans leur aspect et leur activité, portent le nom de « papaine ». Aussi, avant d'essayer de les classer d'après leur taux d'activité protéolytique par exemple, serons-nous très prudente dans l'adoption d'une définition générale.

On peut considérer la papaine comme étant un ensemble d'enzymes protéolytiques contenues dans le suc du papayer : *Carica papaya* L., Papayacées. On désigne sous le nom de papayer des arbres d'une vingtaine d'espèces du genre *Carica* : *Carica cauliflora* Jacq., *pyriformis* Wild., *microcarpa* Jacq., *papaya* L., *quercifolia* Solms., ..... et une variété signalée comme toxique : *Carica digitata* Spreng. (28). L'espèce officinale étant le *Carica papaya* L.. (28).

### *a) Description botanique du Carica papaya L. :*

Arbre originaire de l'Amérique Tropicale, il a 5 à 10 mètres de haut et porte des feuilles palmatilobées à long pétiole. Celles-ci tombent au fur et à mesure de la croissance de la plante, ce qui lui donne un port très particulier : celui d'une longue tige gris-vert terminée par un bouquet de feuilles le plus souvent vertes, quelquefois violettes. (fig. 3, fig. 4).

Si nous disséquons ce tronc, nous y découvrons des cavités membraneuses qui, selon J.B. KILMER, permettent au papayer d'emmagasiner une quantité d'eau considérable à la saison des pluies. (50)(.)

Les fleurs sont unisexuées dioïques, pentamères, régulières. Les arbres femelles portent des fleurs très nombreuses à court pédoncule; celles-ci sont solitaires et comportent une corolle jaune dialypétale, un ovaire supère uniloculaire à placentation pariétale. Le style est divisé en 5 languettes ramifiées. Les arbres mâles ont des fleurs blanches le plus souvent, quelquefois jaunes ou violettes; elles sont portées par des pédoncules grêles, « longs de 2 à 3 pieds » (50), et forment des bouquets odorants. Elles possèdent un verticille de 5 étamines insérées sur la gorge de la corolle gamopétale.

(.) Nous remercions vivement Monsieur le Directeur de l'Ecole Supérieure de Commerce de Nantes, Monsieur TOUCHARD, qui dirige les serres coloniales du Grand Blottereau et qui nous a donné obligeamment un jeune papayer.

Le fruit est une baie allongée, sphérique ou pyriforme . C'est la papaye ou le « melon du nègre » (50) .

*b) Culture du papayer :*

La culture du papayer fut tout d'abord très localisée . Les indigènes des régions tropicales sont très friands de la chair des papayes et la culture des papayers autour de leurs cases faisait l'objet de soins jaloux .

Plus tard, des plantations de papayers furent aménagées avec méthode .

Par sélection des graines, on a pu obtenir des fruits plus doux et plus sucrés . Cette culture se fait aussi bien au niveau de la mer qu'à 900 mètres d'altitude. On sème les graines par paquets dans des sols limoneux ou même dans des terres lourdes . On ne peut distinguer qu'à la floraison les pieds mâles des pieds femelles ; on supprime alors les premiers en ne laissant qu'un pied mâle pour dix pieds femelles .

La production des papayes commence dès le dixième mois, atteint son maximum au cours de la troisième année et dure jusqu'à la sixième année .

*c) Récolte du latex :*

On effectue une entaille dans le péricarpe du fruit encore vert à l'aide d'un couteau en bois ou en os, tout instrument en fer noircissant le suc . Il s'écoule un liquide laiteux, un peu plus dense que l'eau, qui coagule au contact de l'air et ferme l'incision . Celle-ci doit être peu profonde, la pulpe du fruit contenant des antiferments . (30) .

Le latex est localisé dans les laticifères du péricarpe du fruit . Nous en étudierons plus loin la composition détaillée . ( cf. page 17 )

TAINTER et BUCHANAN estiment qu'un papayer donne une production annuelle de latex permettant l'obtention d'une livre de latex desséché et qu'un kilogramme de papaine brute peut être préparé à partir de 2200 fruits . (74) .

*d) Dessiccation du latex - Conservation :*

Une bonne dessiccation du latex doit s'effectuer le plus rapidement possible pour éviter une décomposition sous l'influence de la chaleur . Le procédé le plus simple consiste à laisser sécher le suc à l'abri du soleil, mais il y a souvent noircissement du produit . Or, on constate que l'activité protéolytique décroît quand la coloration s'intensifie . Ceci serait dû à l'oxydation du suc au cours de sa dessiccation à l'air libre, peut-être même, selon FROSSARD, à un début de putréfaction . (32) .

On peut l'assécher également dans des fours en brique que l'on maintient à une température inférieure à 38° afin d'éviter une altération de la papaine .

Une dessiccation sous vide donne un produit blanc-crème beaucoup plus actif .

Ces trois procédés correspondent, dans le commerce, à des produits de qualités très différentes, mais toujours de mauvaise conservation . Nous étudierons plus loin les divers produits commerciaux existant actuellement sur le marché français. ( cf page 14 ) .

Au bout de deux ans, l'activité peut diminuer de moitié (39).

Divers procédés ont été proposés pour améliorer la conservation de la papaine :

- HWANG et IVY signalent qu'une addition de chlorure de sodium au latex frais, suivie d'une déshydratation partielle dans le vide, donne une pâte grisâtre très stable . (44) .
- HINKEL incorpore un antioxygène tel que du bisulfite ou du thiosulfate de sodium au suc de papayer frais (39) , tandis que BALLS acidifie le latex à l'aide d'acide citrique, qui est un activateur reconnu de la papaine . (6) .
- HINKEL propose également une congélation du latex à - 2° , - 4° , procédé que nous avons appliqué pour nos recherches personnelles .

On peut, en effet, critiquer les divers modes de conservation précédemment cités : on ignore ce que deviennent ces produits chimiques lors de l'extraction de la papaine et leur influence exacte sur l'activité de ce ferment .

#### *e) Purification du latex :*

Le suc de papayer est, nous le verrons, un mélange de substances très diverses - cires, graisses, résines, sels minéraux - qui accompagnent le ferment protéolytique proprement dit ; certains de ces composés pouvant être des activateurs , des inhibiteurs ou même des destructeurs de l'enzyme .

La mise au point d'un procédé permettant l'obtention d'un ferment purifié était donc une nécessité.

WURTZ concentrait dans le vide un extrait aqueux de suc de papayer et précipitait la papaine purifiée par dix volumes d'alcool absolu . Un traitement préalable du latex par l'acétate de plomb et des essais de dialyse lui ont donné des résultats encore plus satisfaisants (84) .

KILMER a essayé trente méthodes de séparation de l'enzyme à partir du latex brut. Il propose de le soumettre à l'action successive

de divers solvants : éther, chloroforme, benzène, alcool ; il obtient ainsi une poudre blanche, presque complètement soluble dans l'eau . (50).

WILLSTAETTER préconise une adsorption sur alumine, méthode qui décuplerait l'activité du ferment . (82).

Mais le rendement de ces divers procédés est pratiquement très faible. Actuellement, chaque fabricant a sa méthode personnelle de préparation qui reste souvent secrète . Il y a ainsi un approvisionnement du marché en produits plus ou moins solubles dans l'eau, d'activité protéolytique très variable .

Un de ces fabricants a même réussi à obtenir une papaine totalement hydrosoluble et une poudre lyophilisée très active . (.)

#### *f) Papaine cristallisée :*

On considère souvent l'obtention d'une enzyme à l'état cristallisé comme une preuve de sa purification totale .

En 1937, BALLS , LINEWEAVER et THOMPSON signalent deux formes possibles de cristaux de papaine : en tablettes hexagonales ou en aiguilles fines . Pour les obtenir, ils mettent en solution aqueuse la partie soluble du latex en présence de cyanure de potassium; ils séparent ensuite les protéines actives par précipitation fractionnée à l'aide de sulfate d'ammonium à différents pH . La fraction enzymatique est alors purifiée par précipitations successives de ces solutions aqueuses en présence de chlorure de sodium (7) .

CLOSE a repris la méthode de ces auteurs et l'a appliquée à différents latex . Il a obtenu des plaquettes losangiques à faible biréfringence . (20) .

WILLSTAETTER et GRASSMANN isolent aussi des cristaux de papaine en précipitant par l'alcool une solution aqueuse de latex, que l'on a préalablement portée pendant trois jours à 40° en présence de cyanure . (82) .

BABIN , de son côté, effectue un essai de cristallisation directe sur une solution très concentrée d'enzyme ; celle-ci, conservée sous toluène, est maintenue à 5° pendant 72 heures . Au bout de 24 heures, on voit se déposer des cristaux blancs en fines aiguilles très longues. (4).

Ces divers procédés ont permis à ces auteurs d'obtenir des cristaux de papaine, ou, plus exactement, des produits cristallisés. Nous n'avons pas trouvé de travaux tendant à démontrer l'identité des enzymes ainsi préparées . De plus, quelle est l'activité de la papaine à ce stade ultime de purification ? Là encore, les avis sont divergents :

(.) Ces poudres nous ont été transmises par M. BABIN de Bordeaux, qui a soutenu en 1953 une thèse sur la papaine (4). Nous l'en remercions vivement.

- KIMMEL et SMITH estiment que la papaïne cristallisée a une activité protéolytique spécifique cinq à six fois plus grande que le latex frais . (51) .

- HWANG et IVY lui accordent un pouvoir double par rapport à la meilleure préparation commerciale amorphe . (44) .

Par contre, BABIN pense qu'un tel produit est devenu inactif, soit par oxydation au cours des purifications successives, soit par élimination des activateurs naturels tels que la cystéine ou le glutathion. (4.) .

Nous étudierons plus loin la constitution de la papaïne et nous verrons que nous sommes en présence d'un véritable complexe enzymatique. Nous pensons qu'une purification trop poussée risque d'en éliminer certains constituants ; il pourrait en résulter une diminution du nombre des liaisons peptidiques attaquées pour une protéine donnée, ou encore, une perturbation de l'équilibre des divers facteurs influant sur l'activité de la papaïne . -

II - Différentes formes commerciales : Notre premier travail a été de nous renseigner sur les différentes sortes de « papaïne » existant sur le marché français.

Nous remercions ici tous ceux qui ont mis aimablement à notre disposition de nombreux échantillons de latex de papayer : importateurs, grossistes, fabricants de spécialités . (.) .

Le Codex de 1949 donne cette définition du suc de papayer ou papaïne « *latex épaissi, obtenu par incision un peu avant maturité des fruits du *Carica papaya* L. , Papayacées* » ; il ajoute : « *par dissolution de ce suc dans l'eau et par précipitation alcoolique, on obtient une papaïne purifiée possédant une forte activité protéolytique* . » (22).

Il résulte de ces définitions très larges que, depuis le latex frais jusqu'au produit « purissime » cristallisé, tout ce qui est issu de ces fruits s'appelle « papaïne » quels que soient son mode d'extraction et son aspect.

Nous trouvons, par conséquent, sur le marché français une multitude de produits de formes et de valeurs protéolytiques très diverses.

A priori, nous pouvons les classer en :

{ suc de papayer  
{ papaïne

(.) Etablissements RAVAUD et MOUSCADET - Etablissement FEVRIER - DECOISY- CHAMPION - Compagnie Commerciale des Produits d'Outre Mer : Biddle Sawyer France - J.B. PITTONI - Laboratoires KROTOFF - Laboratoires de l'industrie Biologique Française - Monsieur BADREAU , Directeur de l'Organotechnie de la Coopération Pharmaceutique Française.

a) Suc de papayer :

Le suc de papayer est obtenu par dessiccation du latex brut . Son aspect et sa couleur sont très différents suivant le pays de provenance - Ceylan, Congo Belge , Tanganika , Côte d'Ivoire - , le mode de dessiccation, la méthode de prélèvement et même les divers lots d'une même origine .

La qualité brune est obtenue par simple exposition au soleil du latex frais .

La préparation de la qualité blanche demande plus de précautions : on conserve le latex dans des récipients à l'abri de l'air et on le dessèche au four .

Notons qu'il s'agit là de « papaine brute » c'est-à-dire sans addition de sels minéraux ni de lactose, pratique courante pour la papaine en poudre .

On trouve ce suc sous différentes formes : fragments arrondis ou vermiculés, ou granulés, de grosseur variable . ( cf fig. VI ) .

b) Papaine :

C'est une poudre obtenue par purification du suc de papayer, ceci par des procédés plus ou moins connus, se rattachant à ceux exposés plus haut .

Elle est de couleur blanc-crème, de solubilité variable et très souvent incomplète dans l'eau, la glycérine, l'alcool méthylique, l'alcool éthylique à 70° , mais insoluble dans l'alcool absolu, l'éther, le chloroforme, les huiles grasses et volatiles .

Nous devons signaler que les échantillons de papaine que nous avons eus entre les mains, sont peu solubles dans l'eau, à l'exception des deux signalés plus haut . Ceux-ci - « papaine hydrosoluble » et « papaine lyophilisée hydrosoluble » ( cf. page 13 ) (.) - donnent avec l'eau , des solutions immédiates, visqueuses, jaunâtres.

Au dernier chapitre de notre travail, nous proposerons une classification des « papaines » suivant leur titre protéolytique .

Ce souci de purification du suc de papayer a été une première étape dans la recherche de la constitution de la papaine .

III - Constitution des papaines : La première étude scientifique du suc de papayer a été entreprise par VAUQUELIN en 1802 . (78) . Il définit le latex comme un « sang végétal » , contenant de l'albumine et de la caséine » .

(.) Ce sont là les notations des échantillons que Monsieur BABIN a eu l'obligeance de nous remettre pour notre travail.

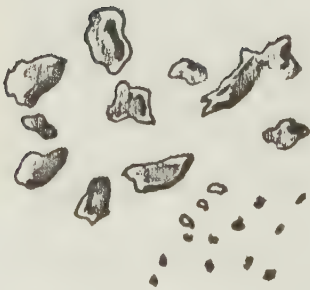
Fig. 6



Congo Belge  
n° 258



Ceylan qualité brune  
n° 293



Ceylan qualité brune  
réf 5/59



Ceylan qualité blanche  
n° 292

D'après photographie de  
H. CORNETEAU

Puis, les chercheurs ont essayé, dans un souci de reproductibilité de leurs résultats, de définir le matériel enzymatique utilisé. Aussi trouverons-nous des analyses de latex brut, de papaïne purifiée, de papaïne cristallisée.

a) Suc de papayer :

L'étude de la composition chimique du suc de papayer a été faite par KILMER d'une part, (50) et par BABIN d'autre part (4).

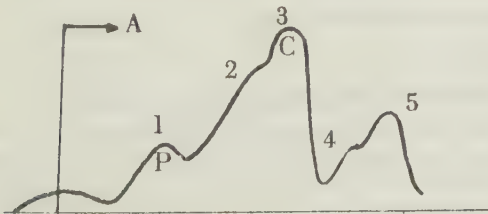
Il résulte de leurs travaux que le suc de papayer se compose ainsi :

|                   |                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| eau               | 2,25 %                                                                                                                                                                                                                     |
| protéines         | 71,20 %                                                                                                                                                                                                                    |
| glucides          | 5,60 %                                                                                                                                                                                                                     |
| lipides           |                                                                                                                                                                                                                            |
| sels minéraux     | <ul style="list-style-type: none"> <li>{ sulfate de calcium</li> <li>{ phosphate de calcium</li> <li>{ chlorure de sodium</li> <li>{ chlorure de potassium</li> <li>{ chlorure de lithium</li> <li>{ carbonates</li> </ul> |
| silice            |                                                                                                                                                                                                                            |
| oxyde de fer .... |                                                                                                                                                                                                                            |

b) Essais de fractionnement :

1 - Chymopapaïne cristallisée

Signalons tout d'abord une étude électrophorétique de latex purifié frais, effectuée par FINKLE et SMITH (31). Elle met en évidence plusieurs pics, au nombre de cinq. Ces auteurs attribuent le premier pic à la papaïne proprement dite et le troisième à ce que JANSEN et BALLS avaient appelé la chymopapaïne. (48). Les pics 2, 4 et 5 seraient dus à des impuretés. Ce travail semble prouver l'existence d'au moins deux ferments.



JANSEN et BALLS ont mis en évidence en 1941 la chymopapaïne dans la partie la plus soluble du latex. (48). Ils la dénomment ainsi en raison de son action sur le lait, semblable à celle de la présure.

La chymopapaïne conserve son activité à pH 2, alors que la papaïne, proprement dite, est inactivée irréversiblement aux pH extrêmes 2 et 13.

La préparation de la chymopapaïne est basée sur cette propriété. On amène le latex, successivement à pH 2 par l'acide chlorhydrique, puis à pH 4 par la soude en présence de chlorure de sodium. On centrifuge pour recueillir la solution active. Celle-ci contient la chymopapaïne qui est précipitée par saturation en chlorure de sodium à pH 2. La chymopapaïne ainsi cristallisée se présente en longues aiguilles ou en plaques. Son poids moléculaire, déterminé par ultracentrifugation, est de l'ordre de 45 000, très supérieur à celui de la papaïne cristallisée qui est de 27 000 à 30 000.

Le test au nitroprussiate est fortement positif pour la chymopapaïne et négatif pour la papaïne. (.) .

La chymopapaïne, nous l'avons vu, coagule le lait ; elle possède également une forte activité protéolytique .

Divers auteurs ont voulu comparer les intensités d'action des deux ferments, mais leurs avis diffèrent :

- JANSSEN et BALLS accordent à la chymopapaïne une activité double de celle de la papaïne cristallisée. (48) .

- HWANG et IVY estiment que toutes deux ont un égal pouvoir coagulant, mais que la papaïne a une activité protéolytique double de celle de la chymopapaïne. (44) .

## 2 - Papaïne cristallisée :

Nous avons indiqué au début de ce chapitre son mode de préparation et nous nous sommes demandée s'il s'agissait d'un corps bien défini .

BALLS et LINEWEAVER (7) , CLOSE , MOORE et BIGWOOD (21) en ont effectué l'analyse élémentaire : ils s'accordent pour trouver un taux de soufre de 1,2% , mais, alors que BALLS et LINEWEAVER estiment la quantité d'azote à 15,5% , CLOSE, MOORE et BIGWOOD trouvent 16,4% . (7) - (20) .

HWANG et IVY signalent que la recherche du phosphore donne un résultat négatif (44) .

La papaïne serait, selon CLOSE et SMITH , une protéine qui contiendrait huit atomes de soufre. (20) - (68) .

CLOSE , MOORE et BIGWOOD ont séparé chromatographiquement sur « Dowex 50 » les acides aminés contenus dans la papaïne cristallisée. Ils ont trouvé trois résidus basiques libres en excès. Ceci correspond aux propriétés basiques de la molécule et à son point isoélectrique de 8,75. (21) .

Ces auteurs distinguent 16 acides aminés différents dans

(.) Test caractéristique des groupements thiols libres .

l'hydrolyse de cette enzyme :

|   |                  |   |            |
|---|------------------|---|------------|
| { | acide aspartique | { | cystéine   |
|   | thréonine        |   | valine     |
|   | sérine           |   | isoleucine |
|   | acide glutamique |   | leucine    |
|   | proline          |   | tyrosine   |
| { | phénylalanine    | { | histidine  |
|   | glycine          |   | lysine     |
|   | alanine          |   | arginine   |

Ils remarquent l'absence de méthionine, rejoignant ainsi les résultats de BLACKBURN qui sont en contradiction avec ceux de BRAND et KASSEL . (13) - (15) .

SMITH , KIMMEL et BROWN s'accordent avec CLOSE (68) - (20) pour affirmer la présence d'un excès de trois groupes basiques qui seraient :

- « le seul groupe imidazole de l'histidine ;
- le groupe terminal  $\alpha$  - aminé de l'isoleucine ;
- l'équivalent d'un groupe  $\epsilon$  - aminé de la lysine » (68)

Des travaux récents ont montré que la leucine est probablement localisée en fin de chaîne de la molécule .

ONCLEY a également démontré que la molécule de papaine est constituée par une simple chaîne peptidique qui aurait un seul groupe-ment  $\alpha$  - aminé libre . (62) .

THOMPSON, de son côté, applique la technique du 1-2-4 fluorodinitrobenzène à la papaine et à la mercuripapaine et conclut à l'existence de deux groupes aminés libres :

- groupe  $\alpha$  - aminé de l'isoleucine ;
- groupe  $\epsilon$  - aminé de la lysine . (77 )

Son travail rejoint donc, en partie, les résultats de SMITH , KIMMEL et BROWN . (68)

Enfin, CLOSE, analysant des cristaux de papaine préparés selon la méthode de BALLS et LINEWEAVER , trouve 88 % du poids moléculaire global sous forme d'acides aminés . Il en conclut que la papaine contient des constituants jusqu'ici inconnus. (20) .

KIMMEL , THOMPSON et SMITH admettent que 6 des 8 atomes de soufre, présents dans la molécule, sont à l'état de cystéine ou de cystine, les deux autres atomes se trouvant sous une forme non encore identifiée . (51)

Lors de l'étude du mode d'action de la papaïne, nous verrons le rôle joué par les atomes de soufre et par les acides aminés soufrés dans des phénomènes d'oxydo-réduction.

Ce soufre se trouverait sous forme de groupements SH qui, selon BAILS et LINEWEAVER, doivent être en nombre pair. Il en existerait donc au moins deux par molécule. (7).

HWANG et IVY s'attachent à démontrer l'importance du groupe diène dans la molécule de papaïne cristallisée (44).

Un groupe aldéhydique, présent dans le complexe chimique, jouerait également un rôle dans l'activité de l'enzyme.

Ainsi, de nombreux chercheurs se sont efforcés de définir chimiquement la papaïne cristallisée. Ils ont choisi cet état parce que la cristallisation leur semblait un critère de pureté suffisant pour la reproductibilité de leurs travaux. En fait, nous l'avons vu, il n'en est rien. Et les résultats obtenus, souvent contradictoires, montrent bien que ces recherches qui mettent pourtant en oeuvre des techniques extrêmement précises, ont été faites sur des substances différentes.

Les seules bases certaines restent les suivantes : très forte teneur en acides aminés de la molécule protéique, présence de soufre et d'acides aminés soufrés dans la chaîne peptidique.

### 3 - Fractionnement d'une papaïne commerciale, soit par

l'alcool éthylique, soit par l'acétone :

K. BAHADUR isole par ces deux méthodes sept fractions enzymatiques à partir d'une papaïne commerciale courante. (70). Il étudie ensuite l'activité protéolytique des fractions ainsi isolées sur de la caséine, en présence d'un activateur ( $\text{SH}_2$ ) et d'un tampon (acide borique - borax, à  $\text{pH} = 8,08$ ) ; puis leur pouvoir coagulant sur du lait calcifié. De plus, il fait varier la température du flacon d'hydrolyse de  $30^\circ$  à  $50^\circ$ , en notant la température optimum pour chaque fraction.

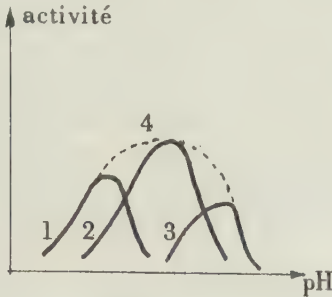
Ses tableaux de résultats montrent que chaque fraction possède une activité protéolytique ou coagulante qui lui est propre, ainsi qu'une température optimum d'action.

Il conclut : la papaïne semble contenir plusieurs enzymes distinctes puisque les courbes d'activité des différentes fractions enzymatiques sont nettement dissimilaires. Il pense également que ces fractions pourraient s'attaquer à des liaisons peptidiques différentes d'un substrat donné. (70)

#### c) Complexe enzymatique

En plus des conclusions de KRISHNA BAHADUR et SINHA

RAMUSH CHANDRA (70) , d'autres faits peuvent amener à penser à un complexe enzymatique :



- 1, 2, 3 se rapportent à des ferments différents.  
4 à l'ensemble du phénomène.

— d'une part, l'action protéolytique totale semble dépendre très peu du pH ( la papaine peut agir de pH 3 à pH 11) et tout se passe comme si la courbe générale représentant l'influence du pH n'était que la somme de courbes juxtaposées plus étroites et plus spécifiques . ( cf. la figure ci-jointe schématisant ce phénomène ) .

— d'autre part, le champ d'action de la papaine est lui aussi très large :

- elle hydrolyse les peptides libres ou acétylés ou même complètement substitués et les amides d'amino-acides ; (82) .
- elle attaque les substrats synthétiques tels la leucylglycylglycine, l'hippurylamide ou la benzoylisoglutamine ; (9) .
- SUMNER et MYRBACK signalent son action sur les thioesters, les amides, les oligopeptides et même les dipeptides, ( ceci en contradiction avec BERGMANN ) et tous les substrats synthétiques à liaisons peptidiques ; (71) - (10) .
- c'est à la fois une aminopolypeptidase et une estérase ;
- elle catalyse des réactions de transamidation . (9) .

C'est ainsi que BERGMANN , ZERVAS , FRUTON (10) , WILLSTAETTER , GRASSMANN (82) , IRVING (46) , HINKEL et AARON ARNOLD ( 40) sont unanimes à discerner deux ferments dans la papaine .

Pourtant leurs avis diffèrent sur le mode d'action et les conditions d'activité de ces deux enzymes . Ils leur ont donné des dénominations différentes et nous allons résumer leurs conclusions respectives:

- 1) HINKEL et AARON ARNOLD distinguent deux états d'activité : un état actif et un état réversiblement inactif .

Sous la première forme, la papaine digère les protéines et coagule le lait sans activation préalable .

Sous la seconde forme, elle ne montre ses propriétés qu'après une activation par des agents tels que l'hydrogène sulfuré , l'acide cyanhydrique, la cystéine, les mercaptans .....(40) .

E.T. HINKEL et CALVIN ZIPPIN indiquent comment évaluer ces deux sortes d'activité en faisant une étude parallèle de trois dosages possibles de la papaine : digestion de viande de bœuf, digestion

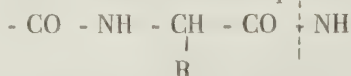
de gélatine et « caillage du lait » . (41) .

Nous étudierons plus loin les principes de ces méthodes et nous nous contenterons de donner ici les conclusions rapportées par ces auteurs :

- la méthode de dosage par digestion de viande de boeuf permet de mesurer la somme des états « actif » et « réversiblement inactif » ; en effet, certains produits de l'hydrolyse de ce substrat activent la papaïne ;
- la méthode par digestion de la gélatine mesure seulement l'état « actif » car la réaction n'est pas autocatalysée ;
- de même, la coagulation du lait concerne uniquement l'état « actif » .

2) BERGMANN , ZERVAS et FRUTON envisagent l'existence de deux enzymes distinctes dans la papaïne commerciale :

- la papaïne -peptidase I , qui attaque seulement les substrats contenant une chaîne telle que :



C'est ainsi qu'elle hydrolyse la benzoylisoglutamine . Elle est inhibée par la phénylhydrazine et d'autres substances agissant sur les carbonyls .

- la papaïne -peptidase II , qui hydrolyse les peptones d'albumine et de gélatine .

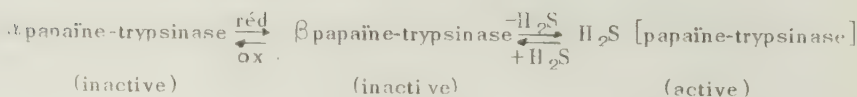
Elle est activée par la phénylhydrazine . (10) .

3) WILLSTAETTER et GRASSMANN discernent deux formes enzymatiques réversiblement transformables :  $\alpha$

et  $\beta$  ; (32) leurs spécificités étant semblables à celle de la trypsine pancréatique, ils les ont nommées :

$\left\{ \begin{array}{l} \text{papaïne-trypsinase } \alpha \\ \text{papaïne - trypsinase } \beta \end{array} \right.$

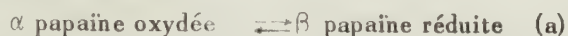
Toutes deux sont normalement inactives et n'acquièrent leur pouvoir protéolytique que par association avec un activateur . On peut représenter ce mécanisme par le schéma suivant :



On aboutit ainsi à l'existence d'un composé actif dissociable .  
[ (papaïne -trypsinase ) - activateur ] .

HWANG et IVY notent que, dans des conditions anaérobies strictes, le coefficient protéolytique de la papaine dépend de l'activateur employé . (44) .

4) IRVING , FRUTON et BERGMANN en 1942, basent leur nouvelle théorie enzymatique sur l'existence de deux papaines  $\alpha$  et  $\beta$  . La forme  $\alpha$  est inactive ; elle est transformable sous l'action des produits sulfhydryle en une papaine  $\beta$  , qui, elle, est activée par l'acide cyanhydrique .



La réaction (a) ne peut être réalisée par l'addition d'acide cyanhydrique mais par des traces d'hydrogène sulfuré ; la réaction (b) donne des enzymes actives différentes selon l'activateur utilisé . (46) .

IRVING , FRUTON et BERGMANN font un tableau des *coefficients protéolytiques* obtenus avec les diverses coenzymes :

|                    |            |
|--------------------|------------|
| hydrogène sulfuré  | c = 0,12   |
| acide cyanhydrique | c = 0,30   |
| glutathion         | c = 0,30   |
| cystéine           | c = 0,38 ; |

le thiosulfate de sodium réagit également, en quantité équimoléculaire, avec la papaine, pour donner un ferment actif .

Ces différentes espèces enzymatiques sont, en fait, théoriques : elles n'ont pas été isolées ; elles permettent seulement à leurs auteurs d'expliquer un mécanisme de réaction.

Notons que WILLSTAETTER et GRASSMANN d'une part, IRVING et FRUTON , d'autre part, semblent avoir envisagé deux théories semblables . Une étude chimique plus poussée permettra peut-être un jour de mettre en évidence ces composés chimiques intermédiaires .

Tous ces travaux sur la constitution chimique de la papaine dénotent quelques contradictions, mais montrent que la papaine contient un mélange assez complexe de deux ou plusieurs enzymes protéolytiques. Ce fait compliquera, nous le verrons plus tard, la recherche d'un substrat convenable pour le dosage de la papaine.

De plus, il est ainsi démontré que les divers activateurs et inhibiteurs interviennent dans le degré d'activité et il faudra en tenir compte dans la mise au point du dosage .

#### d) Autres constituants du latex .

Comme il faut s'y attendre lorsqu'on analyse un suc végétal, on trouve dans le latex du papayer, à côté des ferments protéolytiques, d'autres substances enzymatiques et même un antiferment, l'antipapaine, citée pour la première fois par EFFRONT (30) . Nous reviendrons sur cette substance lors de l'étude de l'action de la papaine par voie intraveineuse sur l'oreille du lapin . (cf. page 28)

Le latex possède une faible activité lipasique, même après dessiccation, (50) tandis que le pouvoir amylolytique n'est important que pour le suc frais . (39) .

MEYER signale la présence de lysozyme . (59) .

On trouve également dans ce suc une substance analogue à l'hyalurodinase .

Il y aurait enfin une pectase, ainsi qu'une substance flocculant le fibrinogène et amenant la coagulation du sang . RUBINSTEIN signale : « toutefois, le caillot obtenu est plus mou que normalement et il n'y a pas de filet organisé » . (66 )

EAGLE et HARRIS pensent à l'existence d'une phytothrombine, que l'on trouve dans la papaine commerciale brute, mais qui n'appartient pas à la fraction protéolytique de l'enzyme . (29) .

BABIN signale que la papaine contient une collagénase analogue à celle des anaérobies strictes . (4)

### IV - Usages de la papaine

#### A ) Utilisation empirique

Nous ne ferons que citer l'utilisation alimentaire de la papaye par les indigènes ; celle-ci concerne uniquement le fruit et non le suc qui en exsude par incision.

Nous tenons à signaler toutefois qu'une utilisation empirique du latex du papayer a débuté parallèlement à la consommation du fruit dans ces régions tropicales .

Le nom de *Carica papaya* viendrait de « caraïbe ababai » . (50) . Les Caraïbes ont, en effet, longtemps employé la pulpe comme cosmétique et antiulcéreux . Ils lui attribuaient également le pouvoir d'enlever les taches du linge, par application directe, ou par l'emploi d'une suspension de cette pulpe dans l'eau de lavage (50). C'est ainsi qu'ils appelaient le fruit du papayer le « melon blanchissant » . (74) .

Notons que l'on a fait également dériver le mot papayer du terme anglais « papaw » qui désigne la papaye . (50) .

Le pouvoir de ramollir les viandes dures est mis à profit par les chasseurs qui suspendent le gibier aux branches des papayers ou le font cuire avec des morceaux de papaye .

Enfin, les indigènes préparent des sirops, des élixirs , à base de papaye et l'administrent comme tonique et expectorant .

Ce rapide historique nous montre que les premières utilisations empiriques du suc de papayer ont, comme souvent en thérapeutique végétale, servi de base aux applications actuelles. Celles-ci sont fort nombreuses . Nous les examinerons et terminerons ce paragraphe par son utilisation au stade industriel, qui se généralise de plus en plus.

### B ) Utilisations thérapeutiques et biologiques

1) Médicament digestif puissant : La papaïne a une activité protéolytique intense « in vitro » sur de nombreuses protéines, d'origine animale ou végétale. Ce pouvoir et son analogie avec d'autres ferments digestifs ( trypsine, pepsine ) ont donné l'idée de l'utiliser comme succédané de la pepsine et de la pancréatine .

AARON ARNOLD , J.R. SCHMITZ et H. BLUMBERG ont démontré l'activité digestive de la papaïne « in vivo » , en soumettant un rat à un régime papainique et en observant une augmentation du pH de son contenu stomacal. Cette élévation du pH est due aux propriétés antiacides des produits d'hydrolyse des protéines; elle est donc une preuve de l'activité de la papaïne dans les conditions de pH du milieu stomacal . (3) .

W.H. WIZAN , R.J. SHEPHERD et AARON ARNOLD effectuent des essais de régime à base de soja et de papaïne sur des chiens . Ils concluent : « la papaïne, administrée lors d'un régime ne contenant que des graines de soja, augmente la digestion de ces protéines beaucoup plus que la capacité propre de digestion de ces animaux » ; « de plus, elle réduit de façon très nette la quantité de graines de soja nécessaire pour maintenir les chiens en équilibre azoté lors d'une diète sévère. » . (83) .

Ces auteurs ont ainsi justifié l'utilisation de la papaïne dans les troubles digestifs, en particulier les gastroentérites infantiles, les insuffisances gastriques ou pancréatiques . C'est un excellent facteur de nutrition qui favorise l'assimilation des protéines . .

On l'administre généralement aux doses de 0,10 g à 0,50 g par jour sous forme de cachets, d'élixirs, de sirops et de vins.

2) Activité anthelminthique : BOUCHUT expose le premier en 1880, les possibilités d'utilisation de la papaïne comme anthelminthique dans un texte intitulé : « Sur le traitement des toénias par les vermivores » . (14) . (.)

MENDEL et BLOOD constatent en 1910 que le suc produit par l'ascaris inhibe l'activité de la trypsine et de la pepsine mais est sans effet vis-à-vis de la papaïne . (57) .

ROBBINS note que cette enzyme digère les cellules vivantes (65) .

En 1946 , des médecins militaires français et allemands reprennent l'idée émise par BOUCHUT . Ils font des essais d'utilisation de la papaïne pour lutter contre une infestation massive par les vers, en une période de sous-alimentation . Les premières publications scientifiques de ces tentatives furent faites à l'Institut de Biochimie de Berlin, alors replié à Ulm, par le professeur AMMON . (1) .

J. CARLE étudie une spécialité contenant de la papaïne activée par 10 % de chlorhydrate de cystéine . (18) . Il estime que, pour attaquer les nématodes, la papaïne fait appel à un processus chimiofermentatif ; il écrit : « son action sélective se fait en plusieurs stades : dans le premier, la carapace est attaquée dans ses points faibles et est légèrement éraillée ; dans le second, elle se fissure largement et le ver apparaît comme boursoufflé et éclate en plusieurs endroits ; dans le troisième, les plaies du parasite , qui est désormais immobile, laissent au suc et aux ferments intestinaux la possibilité d'achever la désagrégation . » (18) .

Les oeufs ne seront pas attaqués car ils sont dépourvus de kératine, d'où la nécessité d'un lavement évacuateur dans ce traitement .

On donne en général 6 à 9 grammes du mélange : suc de papayer - chlorhydrate de cystéine (10 %) , en trois ou quatre fois dans une journée .

### 3) Traitement des plaies infectées RIGAUD, BRISON et BABIN (5) retrouvent

dans des écrits anciens une utilisation assez curieuse des fruits du papayer. Elle consistait à appliquer des tranches de papaye sur les plaies infectées ou sur les furoncles . Ces auteurs cherchent une

(.) La bibliographie ayant trait à l'utilisation de la papaïne comme anthelminthique nous a été obligeamment communiquée par notre Confrère J. MANENT des Laboratoires Krotoff. Nous l'en remercions vivement .

explication scientifique à cette pratique . (5) .

Ils observent une action « in vitro » de la papaïne « sur les caillots de sang, le pus, le collagène et les hématies » ; en particulier , « le pus ainsi traité est transformé par liquéfaction rapide de la fibrine, puis lyse cellulaire des mononuclées , des histocytes, puis des polynucléaires » . (5) .

Ils notent, en contradiction pourtant avec ROBBINS ( voir ci-dessus page 26 ) , LANSONS , BERGER et ASPENJON (65) , que la papaïne « ne s'attaque qu'aux éléments morts et non aux tissus vivants » . Ils écrivent également : « la papaïne fluidifie « in vivo » le pus et en détruit lentement tous les constituants, elle possède une activité antitoxique » .

Ils préconisent donc son emploi en pulvérisations sur toutes les suppurations chroniques ou aiguës à foyer limité .

COSTE compare son activité à celle de la streptokinase et de la streptodornase . Il l'utilise comme un véritable « bistouri biologique » sur les plaies infectées , sous la forme d'une pommade : (23)

|   |          |           |
|---|----------|-----------|
| { | papaïne  | 3g.       |
|   | vaseline | qsp 100g. |

La papaïne peut être associée à la pénicilline ; en effet, elle inhibe la pénicillinase mais non cet antibiotique . On l'emploie donc avec succès sous cette forme dans les plaies atones, les brûlures, les abcès, les furoncles, les anthrax ....

#### 4) Administration par voie sanguine: RIGAUD, BRISON et

BABIN (5) estiment que

la papaïne agit comme un antigène, ce qui interdit son administration par voie sanguine . Ils notent que son action est faiblement et lentement hémolytique et qu'une injection intrapéritonéale de 0,005 à 0,006 g. de papaïne tue une souris de taille moyenne .

TAYEAU et BUFTE indiquent que ce ferment, agissant sur les lipoprotéines du sérum sanguin, amène une libération de cholestérol . (75) .

FLEURY et COURTOIS , dans leur ouvrage sur les diastases, écrivent : « la papaïne, infiltrée sous le derme, sensibilise le lapin ; l'injection ultérieure de papaïne, sans effet chez le témoin, provoque un violent choc anaphylactique chez l'animal sensibilisé . Si l'on administre progressivement de petites quantités de papaïne à ce lapin, il y a formation d'une antipapaïne capable de précipiter la papaïne de ses

solutions . » (24 ).

En 1956, un biologiste américain, LEWIS THOMAS , injecte dans la veine auriculaire d'un lapin une petite quantité de papaïne . Quelques heures après, les oreilles de l' animal ne sont plus rigides, elles pendent comme celles d'un épagneul, ceci durant quelques jours , puis reviennent à la normale .

Ce phénomène, observé de nombreuses fois par l'auteur, a été vérifié sur de jeunes lapins par A. DELAUNAY de l'Institut PASTEUR . Celui-ci a été vivement intéressé par cette expérience et, dans sa publication d'Août 1960 de la « Revue Française de Gériatologie », il insiste sur les faits suivants : (25 )

- « seule, la papaïne brute agit; la papaïne cristallisée est inactive, même après activation par le chlorhydrate de cystéine ; la papaïne cristallisée active est directement fixée par les protéines plasmatiques et ne peut atteindre, par conséquent, les cartilages; la papaïne brute, inactive, peut, au contraire, traverser le milieu sanguin sans être arrêtée; elle se fixe dans les tissus et, au niveau des cartilages, elle redevient active pour des raisons encore inconnues ;
- la broméline et la ficine ont une action semblable ;
- le retour à la normale des oreilles des lapins ainsi traités est retardé chez les animaux soumis préalablement à des injections d'hormones ( cortisone par exemple );
- l'enzyme semble agir en attaquant un constituant de la matrice cellulaire, la chondromucoprotéine . Celle-ci est constituée par une mucoprotéine, une protéine globulaire et des mucopolysaccharides : les acides chondroïtinesulfuriques A et C . Lors de l'attaque par la papaïne, les protéines seraient détruites, les acides passeraient dans le sang, puis dans l'urine . L'édifice cartilagineux, n'ayant plus sa clef de voûte ( la chondromucoprotéine ) , s'effondrerait jusqu'à ce qu'il se produise une reconstitution biologique de cette substance . »

Cette étude est très intéressante, elle prouve que le cartilage peut être altéré « in vivo » par une enzyme, la papaïne . Certes, ce ferment n'existe pas à l'état naturel dans le corps humain, mais des enzymes naturelles semblables se trouvant dans les tissus humains, peuvent fort bien intervenir . Et « inhibées à l'état naturel normal, ces enzymes n'agiront que lorsque les inhibiteurs qui les bloquaient seront, pour une raison ou une autre, éliminés . » (25) . A. DELAUNAY pense, en écrivant ceci, aux processus rhumatismaux ou encore au vieillissement des tissus, qui pourraient s'expliquer par des « lésions des ciments intercellulaires, des liaisons chimiques devenant défectueuses . »

5) Applications biologiques a) Nous signalerons tout d'abord que WALDSCHMITZ-LEITZ , CONRATZ et GLOEDITSCH

ont proposé un *diagnostic du cancer* en 1936 ; leur publication est intitulée : « Recherches sur la diagnose des tumeurs malignes par la papaïne . »

Comme A. PURR et M. RUSSEL l'ont décrit, on trouve, dans le sang des cancéreux, un effet de moindre activation vis-à-vis de la papaïne des protéinases cellulaires que dans le sang des personnes saines . (63).

Cette recherche doit être faite sur le sérum et non sur le sang total . On se sert de papaïne inactivée par oxydation par exemple ou de méthylglyoxalase incomplètement activée .

On peut suivre ainsi un traitement du cancer par les rayons X et l'amélioration du malade et on a la possibilité de s'assurer que toute la substance tumorale a bien été enlevée lors d'une intervention chirurgicale .

b) Homogénéisation des crachats : La papaïne dissout le mucus (74) et

on l'emploie pour homogénéiser les crachats de tuberculeux et de cancéreux . (19) . On l'appelle alors souvent « caroïd » .

c) Utilisation en bactériologie pour la préparation des milieux de culture : BABIN et BRISON donnent la formule d'un milieu de culture obtenu par digestion de viande de boeuf et de foie de veau par la papaïne . On peut y ajouter du succinate de sodium . (5) .

Ce milieu permet la culture à l'air libre d'un certain nombre de bactéries anaérobies : *Welschia perfringens*, *Clostridium sporogenes* , *Clostridium tetanii* ...

d) Action sur les autres enzymes : La papaïne inhibe l'uréase et l'antiuréease, la pénicillinase la chaîne oxydée de l'insuline .

Les solutions de pepsine et de papaïne se détruisent mutuellement .

C) Usages industriels :

La papaïne brute est employée dans les tanneries pour nettoyer les cuirs, dans les brasseries pour améliorer le maltage et éviter l'oxydation de la bière, dans les industries textiles pour le traitement de la laine et de la soie .

Des industriels ayant à lyser de grandes quantités de protéines dans la préparation de certains produits pharmaceutiques, utilisent de plus en plus la papaine comme agent protéolytique très puissant. Elle tend ainsi à remplacer la pepsine en raison de l'étendue de son champ d'action (température, pH, milieux divers).

On adjoint ainsi de la papaine en quantité calculée d'après des expériences préalables, pour liquéfier d'une façon très rapide des quantités importantes de foies d'animaux lors de la préparation des extraits de foie.

#### V - Nécessité d'un dosage précis et reproductible des papaines :

Nous pensons que cet exposé des diverses utilisations actuelles de la papaine prouve la nécessité de posséder une méthode de dosage précise et reproductible de cette enzyme.

En effet, si pour obtenir un produit médicinal de valeur thérapeutique toujours comparable, il est indispensable de préparer une papaine convenablement purifiée, il est nécessaire de pouvoir évaluer son activité protéolytique sur des matières protéiques convenablement choisies et dans des conditions de milieu, de température et de temps bien définies.

A. GORIS, A. LIOT, MM. JANOT nous donnent d'ailleurs cette définition : « La papaine est un ferment hydratant protéolytique d'origine végétale, agissant en milieu neutre sur les matières protéiques naturelles pour les dissoudre et les hydrolyser jusqu'aux termes peptones et acides aminés ».

Or, un tel dosage est difficile à envisager a priori, car nous avons vu que les papaines étaient, en réalité, des mélanges plus ou moins variables de diverses enzymes. On ne peut même pas, pour l'instant du moins, considérer que l'on est en présence d'un mélange de composés chimiques bien définis.

Les méthodes de dosage à envisager peuvent donc être imposées seulement par les utilisations pratiques ; évidemment, il faudra tenir compte du mode d'action global de la papaine sur les substrats habituels. Etant données la complexité du mélange enzymatique et la diversité d'action possible de la papaine, il faudrait presque un test par activité étudiée de l'enzyme.

Comme pour de nombreux produits biologiques, tous les facteurs influençant le dosage seront à examiner : concentration relative de l'enzyme et du substrat, température et temps d'hydrolyse, pH du milieu de réaction, présence de substances chimiques, souvent actives à l'état de traces, et qui constituent les activateurs et les inhibiteurs.

Un tel dosage peut être basé sur deux données que nous rappellerons ici .

- nécessité de s'appuyer sur la mesure d'une activité protéolytique puisque le latex du papayer est essentiellement constitué par plusieurs ferments doués de pouvoir protéolytique;
- nécessité de choisir un test de fin de réaction qui sera fonction de la nature (soluble ou insoluble ) du substrat utilisé .

## VI : Rappel de la notion de titre des ferments protéolytiques :

L'activité d'une enzyme est exprimée arbitrairement en unités :

«ces unités ont été déterminées dans des conditions données de substrat ( nature et concentration ) , de température et de pH , c'est-à-dire dans des conditions telles que tous les facteurs, connus pour leur influence sur l'enzyme, soient maintenus aussi constants que possible» (82) .

Ainsi, l'unité d'activité trypsique de WILLSTAETTER est : « la quantité de trypsine capable de libérer à partir de la caséine des groupes carboxy équivalents à 1,05 ml. d'acide 0,2 N en 20 minutes à 30° » . (82).

On voit ici le caractère arbitraire d'une telle définition :

Pour la papaine, on a défini plusieurs unités :

- l'une d'elles s'exprime ainsi : « on appelle titre protéolytique de cette enzyme le nombre de fois son poids de fibrine fraîche ou desséchée que ce ferment peut peptoniser dans les conditions déterminées par le Codex . » (4) ;

- l'unité Ramon est : « la quantité de papaine nécessaire pour liquéfier, en 4 heures au thermostat à 45°, 2 ml. d'une solution à 4 ‰ de gélatine » (64) ;

Citons également les unités de :

- BAILS et LINEWEAVER ( lait ) ; (7)
- ANSON ( hémoglobine ) ; (2)
- BALLS ( hippurylamide ) . (6) .

Nous noterons dès maintenant que, pour l'utilisateur, il est pratiquement impossible d'établir des relations précises entre les divers systèmes d'unités .

De plus, dans la définition même de ces unités, nous entrevoyons déjà les difficultés de réalisation du dosage envisagé .

On se borne, en effet, à indiquer le substrat à utiliser, le temps d'hydrolyse, la température du bain-marie dans lequel on devra placer le flacon de réaction, quelquefois la concentration relative du sub-

trat et de l'enzyme .

Mais il reste de nombreuses inconnues: définition exacte du substrat à employer, éventuellement teneur en eau de ce substrat, souvent pH du milieu d'hydrolyse ou tampons à utiliser, précision et ordre rationnel des conditions opératoires .

Nous verrons, dans l'étude d'un dosage particulier, papaine - fibrine, l'influence de ces divers facteurs sur les résultats du dosage .

Enfin, nous constaterons, dans l'étude de l'action de masse pour ce même dosage, que le titre ainsi défini varie avec la quantité d'enzyme utilisée, diminuant quand le poids de papaine augmente pour une même quantité de substrat .

Nous nous proposerons de donner une nouvelle définition du titre .

## VII : Mode d'action et facteurs d'activité de la papaine

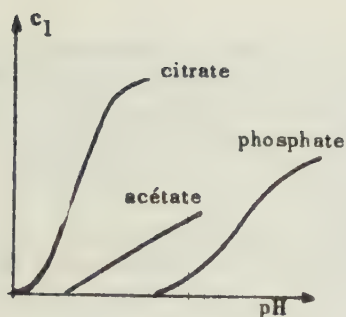
### A) Influence du pH :

WURTZ considérait la papaine comme appartenant au « groupe des trypsines pancréatiques agissant en milieu neutre, légèrement acide ou légèrement alcalin » . (84) .

Par contre, HIRSCHLER (42) pense que l'enzyme n'agit bien qu'en milieu acide et d'autres savants estiment que l'activité augmente avec l'alcalinité .

Nous avons vu que, seuls les pH extrêmes l'inhibent, (cf p.21) mais, à l'intérieur de ces limites, la papaine, agissant sur un substrat donné, possède un optimum d'action à un certain pH . De nombreux auteurs ont recherché ces points particuliers d'activité maximale; ils ont constaté que ces pH favorables étaient particuliers à chaque substrat :

- selon WILLSTAETTER et GRASSMANN , le pH optimum de la digestion de la gélatine se fait à 5,0 et pour l'hydrolyse de la fibrine de 7,1 à 7,3 ; (82)
- B. GAUTHIER , CAPPELAERE et GEOFFROY vérifient qu'au cours du dosage selon le Codex 1949, tel qu'il est pratiqué actuellement, le pH du milieu d'hydrolyse se situe entre 7,5 et 7,7 . Ils pensent donc qu'il n'est pas nécessaire de modifier à l'aide de tampons le degré d'acidité ou d'alcalinité du liquide d'hydrolyse dans ce dosage . (34) .
- KIMMEL, et SMITH étudient l'effet de la variation du pH sur l'hydrolyse de la benzoyl-L-arginamide par la papaine et ce, en présence d'une solution de cystéine



0,005M . Ils prennent comme critère d'activité le coefficient protéolytique  $c_1$  de la réaction ; ils utilisent différents tampons : solutions de citrates, de phosphates, d'acétates et ils effectuent une étude comparative des différents coefficients  $c_1$  de la réaction papaine - substrat , en présence de ces activateurs . (51) .

- BAMANN et MYRBACK estiment que « l'optimum d'action de la papaine sur un substrat donné se situe aux environs du point isoélectrique de ce substrat, soit généralement à pH légèrement acide ou neutre » (8) .

- MURRAY pense que « le pH optimum et le taux d'activité dépendent du tampon utilisé » . C'est ainsi qu'à un pH donné, « la papaine est plus active dans l'acétate que dans le citrate ; l'activité est encore plus forte dans le phthalate » . Selon cet auteur, cette activité dépend de la faculté de l'anion de former un complexe avec les ions métalliques . (60) .

- BABIN reprend le problème en utilisant de la papaine sans activateur sur divers substrats ; il établit une liste des pH optima : (4)

|   |            |           |
|---|------------|-----------|
| { | fibrine    | 6,5 - 7   |
|   | gélatine   | 5,5 - 6   |
|   | caséine    | 5         |
|   | zéine      | 5,5 - 6,5 |
|   | collagène  | 5,5       |
|   | ovalbumine | 5 - 6     |

Nous pensons qu'il doit y avoir en fait un pH optimum pour chaque type de liaison et que les différentes protéines utilisées comme substrat contiennent ces liaisons en quantité variable .

- Cette variation d'activité avec le pH est-elle intense ?

Madame J. DELMOTTE-PLAQUEF, étudiant ce problème lors de la digestion de la caséine par la papaine, conclut :

« à pH 5 , 50 % des liaisons peptidiques de la caséine sont rapidement hydrolysées et 30 % des acides aminés sont libérés sous forme libre ;

« à pH 7 , seulement 25 % des liaisons peptidiques sont scindées . (27) .

En fait, la papaine agit mieux en milieu neutre, mais si

une acidité ou une alcalinité notable retardent son action, elles ne l'entravent pas . (35) . Et c'est bien là l'essentiel. En effet, c'est la faculté de la papaine d'agir dans n'importe quel milieu qui, en particulier, dans l'industrie, a généralisé son emploi et lui a permis de supplanter d'autres enzymes plus sensibles à l'acidité ou à l'alcalinité du milieu.

Sa grande résistance aux variations de température, que nous allons voir dans le paragraphe suivant, sera un facteur de plus de sa facilité d'emploi.

### B ) Influence de la température :

La papaine est une enzyme remarquablement thermostable . (27) . « A l'état sec, elle résiste à une température de 100° pendant trois heures, en solution, elle n'est inactivée qu'après un chauffage de 30 minutes à 82°5 » . (27) .

D'autre part, nous avons vu qu'une excellente méthode de conservation du suc de papayer brut ou de la papaine purifiée consistait à les conserver à - 4° . ( cf page 12 )

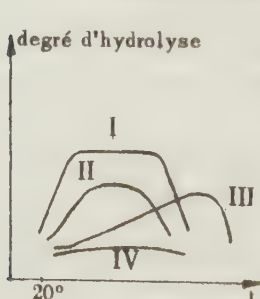
Mais, si la papaine résiste à ces très fortes variations de températures, elle possède pour chaque substrat un maximum d'activité pour une température optimale particulière.

C'est ainsi que WILLSTAETTER effectue l'hydrolyse de la fibrine dans un thermostat maintenu à 40° . (82) .

Le Codex impose la température de 70° (22) .

BABIN opère d'abord à 56°, puis il essaie, à l'aide d'un thermostat réglable, les températures suivantes : 40° , 56° , 70° , 85° , 100° . (4) .

Il établit, par cette méthode, les courbes d'action de la papaine sur différents substrats en fonction de la température . Il en déduit les optima thermiques suivants :



|     |            |           |
|-----|------------|-----------|
| I   | gélatine   | 60°       |
| II  | ovalbumine | 56° - 60° |
| III | fibrine    | 75° - 80° |
| IV  | caséine    | 60° - 70° |

DELEZENNE , MOUTON et POZERSKI admettent une température optimale de 70° pour la fibrine, mais de 90° pour la caséine, soit au voisinage de la température de destruction de la papaine . (26).

Nous retiendrons de ces travaux les résultats suivants :

la papaine est active dans une gamme très large de température et elle possède un optimum d'action à une température donnée, varia-

ble pour chaque substrat .

Nous remarquerons de plus que la température de 70°, préconisée par le Codex pour l'hydrolyse de la fibrine, se trouve dans la zone d'action maximale .

### C ) Activateurs et inhibiteurs :

Comme tous les ferments, la papaïne peut être activée, inhibée ou même complètement détruite par des substances chimiques, présentes dans le substrat lui-même ou ajoutées dans ce but au cours du dosage.

Malheureusement, nous verrons que les études de ces effets d'activation ou d'inhibition ont été effectuées par les divers auteurs sur des enzymes mal définies ou empiriquement définies . D'où, des résultats souvent contradictoires .

Nous allons les signaler succinctement, puis, nous concluons ce rapport en citant les substances dont l'influence est bien établie et en étudiant l'intérêt que présentent ces « modificateurs d'activité » .

- Historiquement, c'est Vines qui a découvert le premier activateur aux environs de 1901 : l'acide citrique . (80) .

- MENDEL et BLOOD étudient, en 1910, l'activation de la papaïne par l'acide cyanhydrique et les composés sulbydrilés . (57) .

- WILLSTAETTER et GRASSMANN continuent cette mise au point . (82) .

- JACOBY signale l'action irréversible diazine sur la papaïne qui est inhibée . (47) .

- En 1929, GRASSMANN recherche la présence d'un activateur naturel dans le suc de papayer ; il pense à une phytokinase « qui ne serait pas du glutathion, mais un peptide composé en grande partie par de la cystéine et de l'acide glutamique » . (37) .

- MASCHIMANN découvre un activateur naturel, contenu dans le suc de papayer, mais il ne peut préciser la nature de celui-ci, tout en affirmant qu'il n'est pas identique à celui de GRASSMANN . (55).

- Citons également les travaux de BERSIN, qui a publié en 1935, la liste des activateurs et des inhibiteurs connus à cette époque (11) .

- KREBS propose, lui, la théorie suivante : la papaïne serait inhibée par les métaux lourds - Cu, Ag, Au, Zn, Cd, Hg - même à l'état de traces (  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  mg par millilitre de solution ) . (52)

Cette inhibition serait réversible et permettrait d'expli-

quer l'activation de la papaine par les cyanures, les sulfures, les citrates et les pyrophosphates, qui déplaceraient les ions métalliques inhibiteurs en se combinant à eux ou en les complexant.

- Nous trouvons également les travaux de SCOTT et SANDSTROM (67), d'HWANG et IVY (44), de BERSIN et LOGE-MANN (12), de MURRAY (60), de FOX et PETTINGA, d'IRVING, FRUTON et BERGMANN (46), de FINKLE et SMITH (31), de KRISHNA BAHADUR et RAMUSH SINHA (70), de NATSHUHITA et TADAO HATA (38).

Nous voyons ainsi que des savants du monde entier se sont penchés sur ces problèmes, et il y a, à l'heure actuelle, de véritables écoles de recherche sur la papaine, aux Etats Unis, au Japon ...

1) **Activateurs reconnus de la papaine** : Les trois principaux activateurs de la

**papaine et les plus utilisés en pratique, sont :**

- { l'hydrogène sulfuré ,
- { l'acide cyanhydrique ,
- { la cystéine .

Plusieurs auteurs ont même établi les courbes d'activation de la papaine en fonction de la quantité d'acide cyanhydrique ou de cystéine .

Ainsi , KREBS fait agir de la papaine sur de la caséine, *en présence d'acide cyanhydrique*, en milieu bicarbonaté .

Il établit plusieurs courbes homologues en faisant varier la quantité de *cystéine* ajoutée de  $10^{-3}$  à  $5 \times 10^{-3}$  mole/litre .

B. GAUTHIER , G. CAPPELAERE et GEOFFROY justifient leur addition de 0,050 g. de chlorhydrate de cystéine, dans le dosage de la papaine, en étudiant l'intensité de l'hydrolyse sous l'influence de quantités croissantes d'activateur . (34) .

La papaine est également activée par :

- { les pyrophosphates
- { les citrates
- { l'acide ascorbique (80) - (11)
- { l'acide thiocarbonique
- { le glutathion réduit
- { la succinodéshydrogénase
- { les ions ferreux à faible dose (55)
- { les ferricyanures
- { l'hémoglobine
- { le paraaminophénylarsénoxyde
- { l'arsphénamine

- |   |                                            |
|---|--------------------------------------------|
| { | le « Versène » ou sel de sodium de l'acide |
|   | éthylène-diaminotétracétique ,             |
|   | le complexe acide ascorbique - fer,        |
| { | le thiosulfate de sodium ...               |

Notons que ce sont tous des réducteurs ou des complexants des métaux lourds .

- 2) Inhibiteurs reconnus de la papaine: Tous les oxydants inhibent l'action papainique. (12).

Tels : { l'oxygène  
 { l'eau oxygénée  
 { l'iode  
 { le brome  
 { l'acide iodacétique (inactivation irréversible )

Comme autres inhibiteurs, on connaît :

- |   |                                                                            |
|---|----------------------------------------------------------------------------|
| { | les fluorures ( qui inhibent d'une façon générale les estérases ) ( 24 ) ; |
|   | les rayons ultra-violet                                                    |
|   | le zinc                                                                    |
|   | la plupart des métaux lourds (52)                                          |
|   | les ions ferreux à <u>forte dose</u> .                                     |

### 3) Théories sur l'activation et l'inhibition :

BERSIN et LOGEMANN d'une part, FINKLE et SMITH d'autre part, ont émis la théorie suivante : puisque les cyanures et les sulfures activent la papaine, qui est inactivée par les oxydants, et qu'elle contient des amino-acides soufrés comportant plusieurs groupements SH libres suivant les auteurs ( 7 ) - ( 38 ) , c'est que, dans sa forme active, elle a ses groupements SH à l'état réduit ; lorsqu'elle est inactive, elle se trouve sous forme de disulfures .

Ces auteurs rejoignent ainsi les théories de KREBS ( 52 ) . Les ions métalliques inhibiteurs seraient fixés à la place de l'ion hydrogène du ou des groupements SH de la papaine . L'acide cyanhydrique complexant ces métaux, le groupement SH est régénéré et la papaine redevient active .

HWANG et IVY résument cette action dans cette phrase : « l'apparente fonction coenzymatique de l'acide cyanhydrique et des composés thiols est, en fait, une protection de l'enzyme de l'oxydation de l'air ou de la combinaison avec les métaux lourds . » (44) .

SCOTT et SANDSTRÖM proposent une autre explication dans laquelle l'activation de la papaine s'expliquerait par un « phénomène de surface » : « l'activateur exercerait son effet à l'interface de l'enzyme et du substrat ». Ceci expliquerait l'inhibition obtenue quand l'activateur est en trop grande quantité. ( voir les ions ferreux page 37 ). (67) .

#### 4) Intérêt des activateurs :

Lorsque l'activateur ne possède pas, à la dose où on l'utilise, d'action thérapeutique ou même de toxicité, et que son action se borne à potentialiser l'activité de la papaine, on peut envisager son emploi dans certaines préparations à base de papaine .

C'est ainsi qu'une spécialité pharmaceutique anthelminthique contient, nous l'avons vu, 10 % de chlorhydrate de cystéine ( cf. page 26 ) .

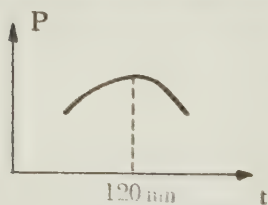
Le Codex de 1937 donnait la formule d'un sirop de papaine , dans lequel entrain de l'eau de laurier-cerise .

MABFLON prépare « une solution aqueuse stable de papaine », contenant de l'acide cyanhydrique et du thio-sulfate de magnésium (54).

Il faudra cependant être très prudent dans l'adoption de telles formules-papaine + activateurs - en thérapeutique .

#### D) Cinétique de l'activité papainique :

FROSSARD étudie la protéolyse de substances protéiques en fonction du temps : il obtient une courbe en deux parties : l'une sensiblement logarithmique, la seconde correspondant à ce qu'il appelle « la période<sup>de</sup>constance » pendant laquelle la quantité d'acides aminés est sensiblement proportionnelle au temps . (32) .



P: poids d'extrait sec

GAUTHIER et ses collaborateurs observent l'hydrolyse de la fibrine, en présence de cystéine comme activateur; ils notent une courbe atteignant un maximum très net à 120 minutes .

BALLS et HOOVER démontrent que le temps de coagulation du lait par la papaine est fonction directe de la concentration enzymatique . (6) .

HOOVER et HOKFS écrivent que la digestion de substances

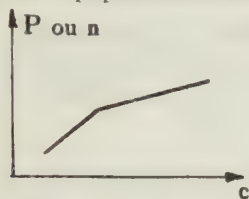
protéiques par le suc de papayer est fonction du logarithme de la concentration enzymatique . (43) . Nous reviendrons plus loin sur cette affirmation . ( p. 108 ) .

Madame VII. LIERS - HUIBAN a fait une étude cinétique analogue dans sa thèse sur la pepsine . ( 79 ) .

Pour mettre au point la définition du titre d'une papaine, ce qui est le but de notre travail, nous avons étudié la cinétique de l'hydrolyse de la fibrine et de la caséine par la papaine . Nous verrons plus loin quelles conclusions nous avons pu en tirer . ( p. 94 à 127 )

### E ) Action de masse :

Madame J. DELMOTTE-PLAQUEE étudie les dosages de la papaine des Codex anglais et français. Elle trace les courbes



n : nombre de ml. de NaOH consommés

d'action de masse correspondantes, en suivant l'hydrolyse d'une même quantité de substrat ( fibrine ou caséine ) par des quantités croissantes d'enzymes . Pour chacun de ces deux graphiques, elle obtient deux droites . ( 27 ) . L'allure même de la courbe nous paraît peu conforme . Comme pour la loi cinétique, nous discuterons de la loi d'action de masse lors

de la mise au point de notre dosage .

Pour l'instant, la seule base connue sera qu'une quantité double de papaine ne donne pas une quantité double de produits de dégradation .

### F ) Mode d'action supposé :

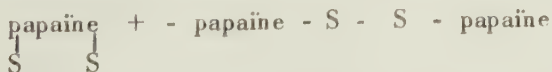
Nous avons successivement passé en revue les différentes hypothèses émises sur la constitution chimique de la papaine , ainsi que les théories d'activation qui ont été proposées .

Plusieurs modes d'action ont été suggérés:

- 1) Les groupes SH sont essentiels : Il y aurait 2 groupements SH par molécule selon

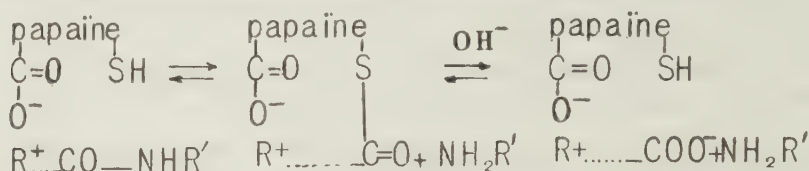
BALLS et LINEWEAVER, 3 selon TADAO HATA et SFTSURO NATSHUHITA . ( 7 ) - ( 38 ) .

La papaine active a ses groupements SH libres ;  
la papaine oxydée se présente sous la forme :



Selon SMITH , KIMMEL et STOCKELL , il y aurait formation

d'un thiolester lors de l'action de l'enzyme sur le substrat : (69)



2) Certains dénie la présence des groupements S - S et SH , étant donné que le test au nitroprussiate est négatif avec la papaine cristallisée . ( cf. page 18 ) . Ils pensent alors à un groupement al-débydrique actif . Cette théorie nous est rapportée par HWANG et IVY sans plus de précision . (44) .

3) D'autres, enfin, auraient mis en évidence un groupement diène qui serait nécessaire à l'activité de l'enzyme . Le groupe SH agirait alors seulement comme activateur d'oxydation et de réduction . HWANG et IVY citent seulement cette théorie . (44) .

Tant que nous n'aurons pas de données plus précises sur l'action chimique de la papaine, les méthodes de dosage seront nécessairement assez délicates à mettre au point .

Nous allons étudier successivement les différentes méthodes de dosage actuellement utilisées, en essayant de dégager celle qui nous paraît la plus logique et la plus réalisable .



## Chapitre II

---

### ETUDE DES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES PAPAINES

---

## II - ETUDE DES DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES PAPAINES

---

De nombreuses méthodes ont été proposées pour mesurer l'activité protéolytique des papaines . Aucune n'est parfaite, ceci est un fait général pour tous les dosages d'enzymes protéolytiques .

On distingue les méthodes basées sur les variations des propriétés physiques des hydrolysats ( viscosité , pouvoir rotatoire ..... ) et les méthodes chimiques ( formoltitration ..... ) .

Nous trouverons de nombreux tests de fin de réaction . Certains peuvent s'appliquer à plusieurs substrats et inversement, il existe souvent plusieurs méthodes de dosage possibles pour un même substrat .

Il convient de choisir tout d'abord un substrat type parmi les nombreuses substances protéiques susceptibles d'être attaquées par la papaine .

Puis, de définir convenablement ce substrat ainsi que les conditions dans lesquelles devra agir la papaine sur cette substance .

Mais il est très difficile de trouver un substrat qui soit toujours d'égale valeur ainsi que de reproduire exactement les conditions opératoires .

Nous allons étudier successivement les divers substrats possibles, les substances qui ont une action activatrice sur la papaine et les tests utilisés dans l'évaluation de l'activité de la papaine .

### I - Etude des substrats

On a tout d'abord utilisé des substrats naturels en essayant ceux qui se rapprochaient le plus des conditions normales d'emploi de la papaine . Puis, dans le souci de simplifier et de normaliser les dosages et aussi pour tenter d'obtenir une explication rationnelle du mécanisme d'action de cette enzyme, on a étudié l'activité de la papaine sur divers substrats synthétiques : nous verrons ce qu'il faut penser de cet emploi.

#### A : Substrats naturels

Nous étudierons uniquement dans ce travail l'activité protéolytique de la papaine .

Les substrats utilisés seront donc tous des substances protéiques, extraites, par des moyens plus ou moins codifiés, de substances naturelles .

Un cas particulier se pose lors de l'utilisation du lait comme

substrat . On se base ici, en effet, non sur l'activité protéolytique de la papaïne, mais sur son pouvoir coagulant .

BALLS et HOOVER ont démontré que celui-ci est un phénomène parallèle et permet une évaluation indirecte du pouvoir digestif de cette enzyme . (6) .

Toutefois, en utilisant toujours les mêmes procédés de préparation et de purification de ces substrats, peut-on espérer obtenir un échantillon constant de fibrine, de gélatine et de caséine ?

C'est certainement très difficile pour la caséine et la gélatine qui nécessitent, pour leur préparation, l'emploi de la **chaleur** et de divers réactifs ( acides , alcalis, eau bouillante ... ) .

La fibrine est obtenue par des moyens plus doux, les risques de dégradation sont donc beaucoup moins grands .

Certains de ces substrats forment, avec l'eau et dans certaines conditions de pH, des solutions , colloïdales certes, mais qui permettent une réaction papaïne - substrat en phase homogène .

D'autres sont insolubles, telle la fibrine, et rendent indispensable une agitation en cours d'hydrolyse .

Nous allons étudier successivement ces divers substrats :

1 - Fibrine de porc : C'est une substance protéique que l'on sépare par battage du sang de porc, suivi d'un lavage à grande eau jusqu'à disparition complète de toute trace d'hémoglobine. On dessèche, soit à l'étuve à une température inférieure à 40° , soit dans le vide après macération alcoolique .

La fibrine sèche correspond sensiblement à quatre fois son poids de fibrine fraîche essorée .

C'est une poudre blanc-crème, théoriquement insoluble dans l'eau ( de par sa méthode de préparation ) , mais qui renferme, en fait, des produits solubles en quantité variable suivant la provenance de la fibrine .

Ces substances solubles seront gênantes dans le dosage du Codex français . Celui-ci, en effet, indique de filtrer l'hydrolysate et d'effectuer l'extrait sec d'une partie aliquote du filtrat obtenu . La pesée d'extrait sec correspondra donc à la somme des produits solubles, extraits de la fibrine dans les conditions de l'expérience, et des produits solubles d'hydrolyse dûs à l'attaque de la papaïne . Il faudra en tenir compte dans le calcul du titre .

De même, la fibrine étant très hygroscopique, on devra, avant dosage, déterminer sa teneur en eau, puisque le titre protéolytique doit être rapporté à la fibrine desséchée .

L'influence du degré de finesse de la fibrine a été étudiée

par Madame J. DELMOTTE-PLAQUEE (27) ; elle indique que le degré donnant les meilleurs résultats d'hydrolyse correspond à celui indiqué par le Codex, soit une ouverture de maille de  $315 \mu$ . ( tamis module 26 ).

2 - Caséine : En principe, il s'agit des albumines du lait. Le produit industriel est très mal défini, car ses propriétés dépendent beaucoup de son mode de préparation. Des études relativement récentes montrent qu'il s'agit d'un mélange plutôt que d'une substance homogène. SUTERMEISTER et BROWN recommandent même de choisir soigneusement pour l'usage du laboratoire la méthode de préparation en fonction du but recherché. (73).

Les caséines les plus courantes au laboratoire sont les suivantes :

- caséines de HAMMARSTEN, VAN SLYKE et BOSWORTH, VAN SLYKE et BAKER, COHN et HENRY, ZOLLER.

Elles sont obtenues par précipitations et redissolutions successives en faisant varier le pH entre la valeur correspondant à leur point isoélectrique et des valeurs supérieures, qui permettent de dissoudre les caséines sous forme de caséinates ;

- caséines obtenues par précipitation à l'aide de présure de lait totalement écrémé.

- caséines très pures, qui ont été soumises à une électrodialyse pour éliminer les sels minéraux.

Les diverses caséines ainsi préparées n'ont pas la même sensibilité à l'hydrolyse (chimique et biologique). Il est vraisemblable que les diverses préparations correspondent aux protéines du lait plus ou moins dénaturées ou hydrolysées.

Ceci peut présenter des inconvénients lors de l'étude de la papaïne, puisque la caséine renferme 0,8 % de soufre ; des acides aminés soufrés risquent d'être plus ou moins libérés et certains d'entre eux peuvent influencer l'action protéolytique de la papaïne.

Madame J. DELMOTTE-PLAQUEE constate ainsi que les résultats de l'hydrolyse varient avec la caséine employée. (27).

La caséine présente cependant un avantage, celui de présenter un point isoélectrique à pH 4,7, donc de pouvoir être dissoute dans des milieux neutres ou faiblement alcalins. On peut espérer réaliser ainsi avec la papaïne des réactions en phase homogène, ce qui n'est pas possible avec la fibrine. ( cf. page 43 ).

KREBS note la teneur assez élevée en métaux lourds d'une caséine qu'il essaie de déminéraliser. Une de ses solutions de caséine contenait  $0,97 \times 10^{-3}$  mg. de cuivre, alors que  $3 \times 10^{-3}$  mg suffisent à inhiber totalement la papaïne. (52).

On peut toutefois se procurer, sur le marché actuel, une « caséine isoélectrique déminéralisée ». (.)

3 - Gélatine : C'est une substance albuminoïde appartenant au groupe des collagènes. On l'extrait du cartilage des os ou des peaux de jeunes veaux par action prolongée de l'eau bouillante.

Nous avons donc, non seulement plusieurs origines possibles de ce substrat, mais des méthodes différentes de préparation, qui peuvent plus ou moins dégrader les protéines ainsi traitées.

KREBS observe qu'une des gélatines qu'il a étudiées n'était pas attaquée par la papaine. « Elle contenait  $1,1 \times 10^{-4}$  mg de cuivre par millilitre de solution à 2 % et 0,97 mg. de zinc par gramme de produit sec. » (52).

La gélatine forme avec l'eau une solution colloïdale qui permet de faire agir la papaine en phase homogène.

4 - Fdestine : « C'est une globuline cristallisée, contenue dans les graines de quelques végétaux et, en particulier, celles du Cannabis sativa L. » (35). Elle est insoluble dans l'eau. (32).

Son utilisation dans le dosage de la papaine a été étudiée par FROSSARD, parallèlement à celle de la fibrine et de la caséine.

5 - Albumine de blanc d'oeuf : On coagule l'albumine de l'oeuf par immersion dans l'eau bouillante de l'oeuf entier pendant 15 minutes ; on pulvérise le blanc que l'on a séparé préalablement du vitellus, de la membrane et de la coquille, puis on le tamise.

6 - Hémoglobine : Elle est préparée à partir de sang de boeuf. CLOSE dit que la préparation de l'hémoglobine est reproductible et permet d'obtenir des vitesses identiques de digestion, quelle que soit son origine. (20).

7 - Viande de boeuf : Nous partons ici d'une substance très complexe, qui rappelle l'utilisation première du suc de papayer pour attendrir les viandes. Ce substrat est beaucoup trop hétérogène pour pouvoir être utilisé de façon reproductible dans des dosages absolus.

Par contre, on peut s'en servir dans des dosages de valeur relative par rapport à une papaine étalon, comme il est pratiqué au National Formulary américain. (61).

(.) Nous remercions vivement les Etablissements ROUSSELOT, qui nous ont obligeamment donné une « caséine isoélectrique déminéralisée ».

## B : Substrats synthétiques :

Certains auteurs ont cherché à pallier le manque de reproductibilité et d'homogénéité des substrats naturels, en employant des substances chimiques bien définies, telles l'hippuramide (7) , ou l' $\alpha$ -benzoyl- l- arginamide ( BAA) ( 37) .

Ces substances n'opposent à la papaïne qu'un type bien déterminé de liaison peptidique ; elles présentent donc une spécificité beaucoup plus étroite que les polypeptides naturels utilisés généralement .

Il s'agit, en outre, de substances à poids moléculaire beaucoup plus faible que les protéines habituellement soumises à l'action de la papaïne . Ceci peut introduire également des différences dans l'activité observée .

Par contre, ces substances permettent des résultats plus précis. Ce sont des réactifs qui permettent l'étude du mode d'action beaucoup plus que des substrats pour des dosages courants .

## II - Etude des activateurs

Nous avons vu, page 35 , que la papaïne, comme tous les ferments, peut être activée par des substances chimiques ajoutées dans ce but au cours du dosage .

Les plus couramment utilisés sont :

- { la cystéine, sous forme de chlorhydrate ,
- { l'hydrogène sulfuré ,
- { l'acide cyanhydrique et le cyanure de potassium.

Nous avons également passé en revue les théories émises pour expliquer le mécanisme d'activation .

Le Codex français n'a pas jugé bon d'effectuer un dosage de la papaïne en présence d'activateur, tandis que le « British Pharmaceutical Codex » a pris la position opposée . (22) - (16) .

## III - Tests de fin de réaction - Dosages

Nous pouvons les classer en deux grands groupes, selon que la protéolyse porte sur un substrat soluble ou non .

### A ) *La protéolyse porte sur un substrat soluble :*

Dans ce cas, la composition de la solution change avec la pro-

gression de la réaction d'hydrolyse, et il suffit d'étudier les variations de certaines propriétés de cette solution :

- soit physiques ,
- soit chimiques .

*B ) La protéolyse porte sur un substrat insoluble :*

Dans ce cas, on peut, en fin de réaction :

- soit, déterminer l'extrait sec à partir d'une partie aliquote du filtrat de cette solution, c'est-à-dire la quantité de produits solubles formés, quelle que soit la nature de ceux-ci ; c'est une méthode purement gravimétrique ;
- soit, doser les produits formés en se basant sur les propriétés physiques de la solution ; ( on a recours à la polarimétrie ) ;
- soit, doser les produits formés en se basant sur les propriétés chimiques de la solution ;
- soit, mesurer la quantité de substrat digéré sur une zone de protéolyse.
- soit, déterminer le résidu qui n'a pas été digéré .

*A ) La protéolyse porte sur un substrat soluble :*

1) Le dosage porte sur les variations des propriétés physiques de la solution :

Polarimétrie : Cette méthode a été appliquée par FROSSARD lors de l'hydrolyse de la caséine par la papaine . (32) .

Nous étudierons plus loin cette méthode en analysant les travaux de BABIN sur les hydrolysats de fibrine (4) ( cf. page 52) .

2) Le dosage porte sur les variations des propriétés chimiques de la solution

a) formoltitration des acides aminés : On fait agir la papaine sur un substrat donné : caséine ou gélatine . On dose les acides aminés formés au cours de l'hydrolyse par formoltitration.

On note le nombre de millilitres de soude N/10 consommés par l'hydrolysats, ceci par rapport à un témoin constitué par la même quantité de substrat et de suspension de papaine ( bouillie et refroidie,

donc inactive ) .

Cette méthode mesure effectivement les liaisons peptidiques hydrolysées . C'est donc, en principe, la plus exacte .

Un seul fait reste à bien définir, si l'on veut obtenir des résultats reproductibles : BULLOCK et SEN pensent que les conditions de pH à observer doivent être bien précisées, si l'on veut effectuer une bonne formoltritation . « En effet, l'hydrolysate obtenu, soit à partir de caséine, soit à partir de gélatine, peut être traité de plusieurs façons :

- être amené à pH 7,0 , puis additionné de formol et titré jusqu'à virage à pH 8,7 ;
- être amené à pH 7,0 , puis additionné de formol et titré jusqu'à pH 7 ;
- ne pas être neutralisé, mais, une fois additionné de formol, titré jusqu'à pH 8,7 ;
- être amené à pH 8,7 , puis additionné de formol et titré jusqu'à pH 8,7 . » (17) .

BULLOCK et SEN préconisent le premier procédé, la digestion papainique commençant à pH 7,0 . Ils effectuent leur dosage en présence de chlorhydrate de cystéine, qui présente le double avantage d'être facilement utilisable et de ne pas être toxique .

L'une ou l'autre de ces techniques est appliquée à la caséine dans les « British Pharmaceutical Codex » de 1934 et 1954, à la gélatine dans l'édition de 1949 de ce même ouvrage . (16) .

#### b) méthode acidimétrique :

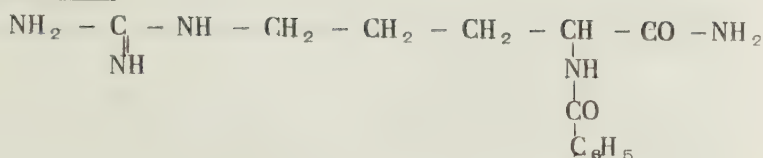
1 - méthode de WILLSTÄTTER-GRASSMANN : On fait agir la papaine sur la gélatine dans des conditions données de pH ( 5,0 ), de température ( 40° ), de temps ( 60 mn ), en présence d'un activateur ( acide cyanhydrique ) .

On titre avant et après hydrolyse, par la potasse alcoolique, en présence de thymolphthaléine . (82) .

2 - méthode de GRASSMANN-HFYDE : On étudie la réaction de désamidation de l'  $\alpha$  - benzoyl - l - arginamide , ou BAA , par la papaine, en présence de chlorhydrate de cystéine et de « Versène » (.) . (37) .

(.) « Versène » = « Sequestren » = « Nullapon » = sel de sodium de l'acide éthylènediaminotétracétique.

formule du BAA :



On titre acidimétriquement les groupements carboxy, en début d'hydrolyse et après des temps appropriés .

FINKLE et SMITH ont montré que l'hydrolyse du BAA par la papaine était une réaction du premier ordre dans les conditions de l'essai. Ils ont calculé les constantes cinétiques, d'après la formule de MICHAELIS -MENSTEN , pour des concentrations de substrat allant de 0,01 M à 0,08 M .

La solubilité du BAA dans l'eau est limitée en présence de ClK ; on ne peut donc choisir des concentrations supérieures à 0,08 M . (31) .

Cette méthode de dosage est très intéressante au point de vue cinétique ; elle essaie d'expliquer le mécanisme de la réaction. Mais, elle dose une activité de désamidation très spécifique . Comment, dès lors, extrapoler les résultats obtenus ?

Le substrat est, de toutes façons, beaucoup trop simple pour le champ d'activité si étendu de la papaine .

3 - méthode de BALLS et LINEWEAVER : BALLS et LINEWEAVER font agir le suc de papayer sur l'hippuramide :



Ils définissent ainsi l'unité d'activité, qu'ils appellent un [Pa . U ]<sup>HA</sup> : « c'est la quantité d'enzyme qui cause une augmentation d'acidité représentant l'hydrolyse de l'hippuramide au taux initial de un milliéquivalent par minute . » ( 7 ) .

c) méthode colorimétrique : méthode d'ANSON à l'hémoglobine :

Cette technique consiste à mettre en réaction une solution chlorhydrique d'hémoglobine et la solution de papaine à étudier, à la température de 25° . La solution de papaine est préalablement activée par contact avec une solution de cyanure de sodium. La protéine non attaquée est précipitée au bout d'un certain temps par l'acide trichloracétique . (2) .

On dose, parmi les produits de dégradation, la tyrosine et le tryptophane ; ceci se fait colorimétriquement après action du réactif de FOLIN et CIOCALTFU .

On peut pratiquer également une spectrophotométrie .

C'est une méthode de dosage rapide, bien reproductible, selon CLOSE , qui prétend que 3 minutes suffisent . (20) .

Pourtant, 10 minutes selon ANSON, 3 minutes seulement selon CLOSE, sont-elles suffisantes pour obtenir une hydrolyse complète et bien reproductible du substrat ? BABIN estime qu'il faut laisser l'hydrolyse se poursuivre pendant 30 minutes à 30° . (4) .

De plus, est-on certain que la quantité d'acides aminés formée est proportionnelle à la quantité de tryptophane et de tyrosine obtenue et mesurée ? Ce test ne mesurerait-il pas plutôt l'action spécifique de la papaine sur les liaisons peptidiques du tryptophane et de la tyrosine dans la molécule d'hémoglobine ?

On fait, en outre, une approximation assez grossière quand on dose le tryptophane et la tyrosine par rapport à un étalon de tyrosine seule .

### *B ) La protéolyse porte sur un substrat insoluble :*

#### 1 ) Détermination de l'extrait sec d'une partie aliquote du filtrat de l'hydrolysate : methode gravimétrique :

a) Méthode du Codex français : Principe : On fait agir une quantité déterminée de papaine

sur une pesée connue de fibrine, substrat insoluble dans l'eau ; on porte deux heures au bain-marie à 70° ; on détermine les produits solubilisés par la papaine en effectuant un extrait sec sur une partie aliquote du filtrat après hydrolyse .

Dosage : Le principe du dosage se rapproche de celui de l'utilisation de la papaine dans la technique industrielle.

Pourtant, il a suscité de nombreuses discussions, tant dans sa forme que dans les conditions de calcul du titre .

I - La seule exigence du Codex est celle-ci : « l'extrait, obtenu en opérant sur 10 millilitres de filtrat, doit avoir un poids au moins égal à 0,300g. » (22).

Or, les échantillons courants de papaine ne donnent jamais l'extrait sec demandé .

FROSSARD indique les résultats suivants : l'hydrolyse de 2,50g de fibrine par 0,050 g. de papaine , en suspension dans 50 ml d'eau, à 70° , pendant 4 heures, ne donne en moyenne que 0,235 à 0,265 g. d'ex-

trait sec pour 10 ml. de filtrat . (32)

Et encore, pour l'obtention de ces résultats, FROSSARD a augmenté la quantité de papaine utilisée et le temps d'hydrolyse par rapport aux prescriptions du Codex. (32)

II - La fibrine, nous l'avons vu, est partiellement soluble, dans les conditions du dosage, et les substances ainsi extraites se retrouvent dans l'extrait sec en fin de dosage et faussent le calcul du titre.

Nous verrons, dans ce travail, comment pratiquer un essai à blanc qui permettra de déterminer la quantité de produits solubles .

III - Le Codex indique : « Dans ces conditions , ( si l'extrait sec de 10 ml. de filtrat a un poids au moins égal à 0,300g. ) , la papaine protéolyse cent soixante six fois son poids de fibrine sèche, ce qui correspond sensiblement à six cent soixante fois son poids de fibrine fraîche essorée, ce que l'on exprime en disant que la papaine possède un titre de 660, ( titre protéolytique ) » (22) .

Ainsi, le Codex fait-il effectuer une détermination d'extrait sec que l'on n'utilise pas dans le calcul du titre .

A quoi bon alors déterminer cet extrait sec si toutes les papaines, qui satisfont à ce que nous appellerons un essai limite, ont ce même titre de 660, titre qui correspond à une papaine idéale qui protéolyserait la totalité de la fibrine qui est soumise à son action ; en effet :

$$\frac{\text{poids de substrat} \times 4}{\text{poids de ferment}} = \frac{2500 \times 4}{15} = 666$$

Or, la pesée de l'extrait sec exigée nous indique que 10 ml. de filtrat devrait contenir 0,300g. de produits d'hydrolyse de la fibrine; donc, au total, 50 ml. contiennent :

$$0,300 \times 5 = 1,500\text{g.} = 1500 \text{ mg.}$$

15 mg. de papaine ont donc hydrolysé 1500mg de fibrine sèche . Selon la définition du titre d'une enzyme, donnée chapitre I, une telle papaine posséderait donc un titre de :

$$\frac{1500 \times 4}{15} = 400$$

Il apparaît ainsi un désaccord entre le poids d'extrait sec exigé et le titre donné .

IV - De plus, devant l'imprécision du titre Codex, qui n'était jamais atteint, les utilisateurs ont, à partir de ce même dosage, effectué des calculs de titre très divers ; ceci amène, sur le marché actuel, une grande confusion sur les valeurs des papaines offertes .

V - Comme pour tout dosage biologique et, surtout enzymatique, les conditions opératoires devront être précisées, ( substrat homogène,

température, concentration, temps d'hydrolyse ... )

b) Modification du dosage Codex : méthode de GAUTHIER, CAPPELAERE et GEOFFROY : (34)

Ces auteurs ont repris les travaux de BULLOCK et SEN sur l'hydrolyse de la caséine par la papaine, en présence de chlorhydrate de cystéine.

Ils ont pensé que « l'amélioration sensible, décrite au «British Pharmaceutical Codex» de 1954, serait également souhaitable dans la technique du Codex français et permettrait ainsi, sans changer les conditions opératoires, de retrouver le titre de 660, que le texte actuel ne permet pas toujours d'atteindre. » (34).

Ils étudient l'influence de la quantité de chlorhydrate de cystéine utilisée sur le poids d'extrait sec obtenu, et concluent à un poids favorable de 0,050 g. pour 0,015 g. de papaine.

Ils reprennent la technique du Codex avec cette seule modification : l'addition au mélange à hydrolyser de 0,050 g. de cet activateur pour 0,015 g. de papaine.

Dans ces conditions, B. GAUTHIER, CAPPELAERE et GEOFFROY considèrent une papaine comme valable si elle titre au minimum 660. (34).

2) Dosage des produits formés en se basant sur les variations des propriétés physiques de la solution :

Polarimétrie : De même que FROSSARD a utilisé la polarimétrie pour l'étude de l'hydrolyse de la caséine par la papaine, de même, cette méthode a été appliquée au dosage par la fibrine.

Et, parallèlement à l'évaluation gravimétrique des produits solubles issus de la fibrine lors de son hydrolyse par la papaine ( que nous venons d'étudier ), le Codex français indique une évaluation polarimétrique sur le filtrat de l'hydrolysat. (22).

Le principe de cette méthode est le suivant : sous l'influence de la papaine, il y a libération, à partir de la fibrine, de molécules à pouvoir rotatoire assez différent de celui des protéides de départ.

Cette mesure de déviation polarimétrique se ramène à un simple essai limite dans la monographie du Codex. Cette déviation du pouvoir rotatoire est un témoin indiscutable de l'activité protéolytique de la papaine, mais ici, elle est considérée comme secondaire et elle n'est pas utilisée dans le calcul du titre. En effet, le Codex indique seulement : « le filtrat, examiné au polarimètre dans un tube de

deux décimètres, devra donner une déviation minimale de  $- 3^{\circ}$  . (22) .

BABIN a mis au point une véritable méthode de dosage polarimétrique des papaines commerciales .

Il effectue parallèlement l'hydrolyse de 2,50g. , 5g. , 7,50g. de fibrine par 0,015g. de papaine et il donne le titre de 400 à une lévoration du filtrat égale à 180 minutes d'arc. D'où , « une minute d'arc équivaut à un titre de 2,222 » . Ceci, en supposant qu'il y ait proportionnalité entre la lévoration et le titre, donc l'activité de la papaine étudiée . (4) .

Cette méthode exige une lecture polarimétrique précise effectuée à l'aide d'un excellent polarimètre. Si l'on veut avoir une précision de  $\pm 2,5 \%$  , il faut une lecture faite pour une bonne papaine à  $\pm 2$  minutes près, ce qui exige déjà un polarimètre convenable .

Les plus courants étant gradués en demi degré avec des verniers au vingtième en lecture directe, il faudrait donc les utiliser avec des tubes de cinq décimètres .

L'autre part, les hydrolysats sont souvent opalescents et il est nécessaire de les filtrer plusieurs fois . BABIN préconise, pour un meilleur résultat, l'utilisation de filtres correspondant à la porosité n° 622 des filtres Schleicherschüll . ( 4 ) .

### 3) Dosage des produits formés en se basant sur les variations des produits chimiques de la solution :

Formoltitration des acides aminés formés : FROSSARD a étudié, parallèlement, la formoltitration des acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse, les variations de pouvoir rotatoire de l'hydrolysate et l'évaluation gravimétrique des produits solubilisés, lors de l'action de la papaine sur la fibrine . (32) .

Il effectue également les mêmes tests avec des substrats différents : édectine et caséine .

Il utilise la formoltitration tout comme BULLOCK et SEN lors du dosage par la caséine . (17) .

Il donne les courbes de température, les lois cinétiques et d'action de masse obtenues par ces méthodes .

### 4) Mesure de la quantité de substrat digéré sur une zone de protéolyse

a) Test de diffusion . Principe : On dépose une petite quantité de papaine,

soit sur une plaque de gélose imprégnée d'une solution de caséinate de sodium à 2 % , soit sur une plaque de gélatine à 5 % ( neutralisée et colorée à l'indicateur de Guillaumin ) (4) .

On porte les plaques à l'étuve pendant un temps déterminé et on mesure les diamètres liquéfiés .

BABIN donne ces essais comme de simples tests indicatifs n'ayant pas la valeur d'un dosage (4) .

b) Test de liquéfaction : On recherche la quantité de papaine nécessaire pour liquéfier totalement un gel de gélatine ( Test de Ramon ) . (64) .

#### 5) Mesure du résidu non attaqué :

Cette fois, au lieu d'analyser les produits solubilisés, on mesure la partie du substrat qui n'a pas été attaquée . Cette méthode est appliquée à deux substrats : l'albumine de blanc d'oeuf ( méthode de Lager ) et la viande de boeuf ( méthodes de GRABER et du National Formulary ) .

##### a) Méthode de Lager : (53)

On fait agir 1, 2 ou 3 millilitres d'une suspension de papaine à 2 milligrammes par millilitre sur une suspension d'albumine . On porte au bain-marie deux heures à 70° . On transvase le mélange dans un flacon jaugé et on lit le résidu d'albumine non digérée .

On a établi auparavant une courbe de titration à l'aide de papaine référence du National Formulary ; on porte en abscisses les logarithmes des concentrations de papaine et en ordonnées les volumes moyens obtenus .

Cette méthode présente, selon les auteurs, l'avantage de pouvoir être appliquée à des préparations commerciales contenant du bicarbonate de sodium, du carbonate de calcium, des sels de bismuth ou de magnésium, à condition que la proportion de sels ne change pas le pH du mélange en solution . (53) .

Toutefois, cette mesure du volume se fait, non par centrifugation, mais après deux heures de décantation .

##### b) Méthode à la viande de boeuf :

Nous trouvons deux méthodes qui diffèrent par leurs conditions opératoires mais seranement au même principe : il s'agit d'une évaluation par centrifugation du résidu de viande non digérée .

Méthode du National Formulary : (U.S.A.) : (61)

On place dans deux tubes à centrifuger un mélange de poudre de viande de boeuf et d'eau . On ajoute, dans un des tubes, une quantité connue de suspension de papaïne, le second tube servant de témoin. On les porte tous deux à 70° , pendant deux heures . On dilue, on centrifuge à 1800 t/mn pendant 30 minutes . On lit les volumes résiduels . La différence entre les deux volumes donne l'activité de la papaïne . (61) .

Il existe une papaïne de référence du « National Formulary » , aucune papaïne américaine ne doit lui être inférieure .

La méthode de mesure du volume résiduel par centrifugation, à une vitesse donnée et pendant un temps donné , est beaucoup plus précise que celle de LAGER .

CONCLUSION :

Aucun substrat n'est parfait et tous sont à peu près équivalents ; mais le test doit être choisi en fonction du substrat ou inversement .

Nous avons conservé la fibrine comme type de protéine insoluble permettant l'emploi d'une méthode de dosage gravimétrique .

En effet, la fibrine est facile à obtenir sur le marché , c'est un réactif courant et qui nous est assuré de façon pratiquement constante par le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments ( fibrine LNCM ) (.)

Parallèlement, nous avons retenu la caséine comme type de protéine soluble permettant un dosage chimique simple par formol titration.

Il est également assez facile de se procurer une caséine à peu près constante et bien définie . ( cf. page 45) .

÷  
÷      ÷  
÷

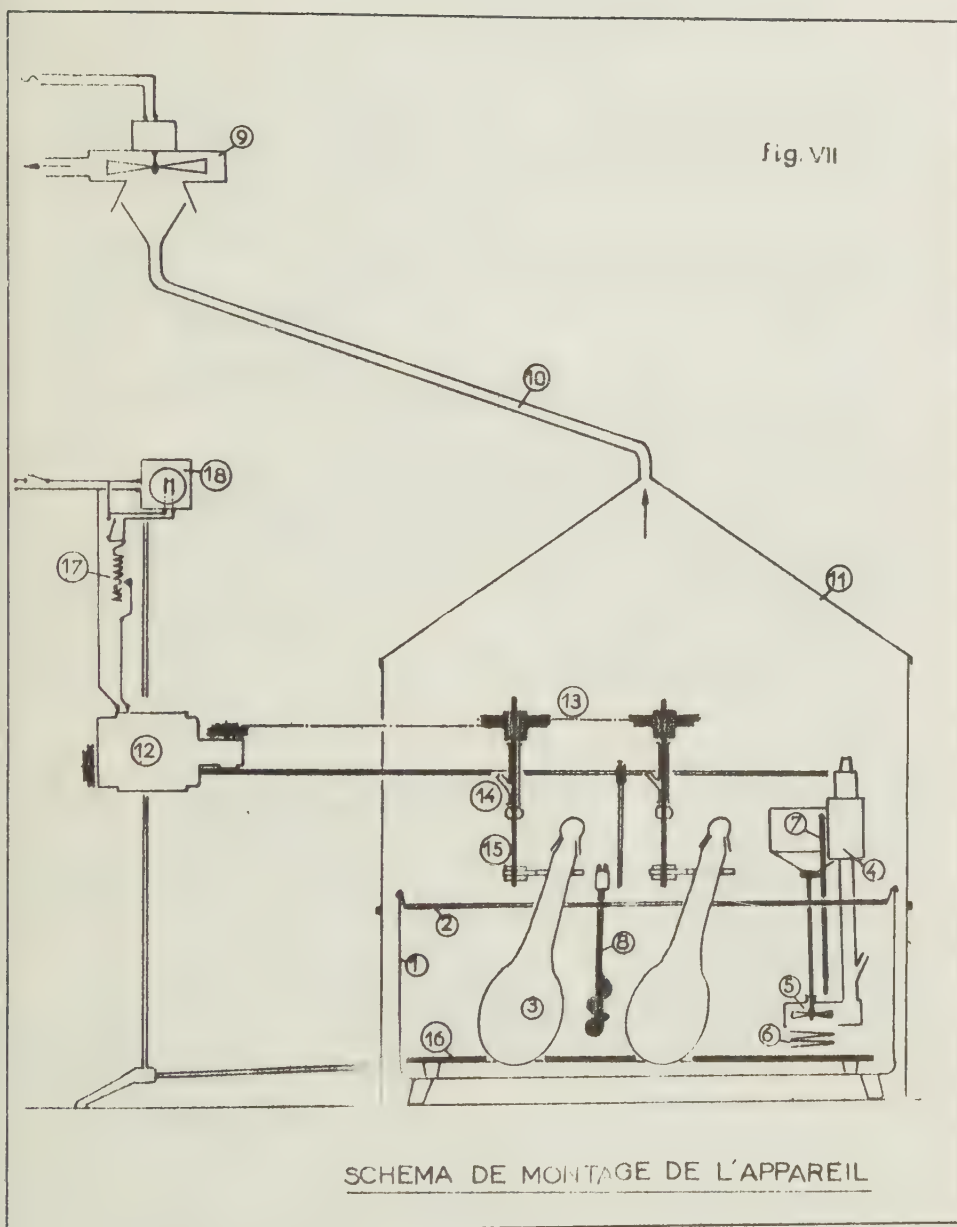
- (.) Nous remercions bien vivement Monsieur le Professeur DOMANGE, Directeur du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu nous fournir toute la fibrine étalon dont nous avons eu besoin pour effectuer ce travail .

## Chapitre III

---

TRAVAUX PERSONNELS  
MATÉRIEL ET RÉACTIFS UTILISÉS

---



# NOMENCLATURE

|    |                                |                           |
|----|--------------------------------|---------------------------|
| 1  | CUVE EN ACIER INOX             | BAIN                      |
| 2  | ECRAN DE CONDENSATION          |                           |
| 3  | MATRAS                         |                           |
| 4  | THERMOMETRE A CONTACT          | REGULATION<br>AUTOMATIQUE |
| 5  | POMPE                          |                           |
| 6  | RESISTANCE CHAUFFANTE          |                           |
| 7  | THERMOMETRE A MERCURE          |                           |
| 8  | THERMOPLONGEUR                 | PRECHAUFFAGE              |
| 9  | VENTILATEUR                    | VENTILATION               |
| 10 | CONDUIT D'ASPIRATION           |                           |
| 11 | HOTTE EN PLEXIGLASS            |                           |
| 12 | MOTEUR                         | DISPOSITIF<br>d'AGITATION |
| 13 | TRANSMISSION                   |                           |
| 14 | PALIER                         |                           |
| 15 | EXCENTRIQUE                    |                           |
| 16 | TOLE DE BASE                   |                           |
| 17 | RHEOSTAT                       |                           |
| 18 | MINUTERIE A CONTACT PERIODIQUE |                           |

### III - MATERIEL ET REACTIFS UTILISES

Nous allons tout d'abord transcrire le texte même du Codex concernant le dosage de la papaine et nous soulignerons tous les termes qui, à notre avis, doivent être codifiés et définis très exactement si l'on veut obtenir des résultats toujours reproductibles .

Nous décrirons ensuite l'appareillage que nous avons mis au point pour réaliser de la façon la plus exacte possible les conditions demandées pour l'hydrolyse : température du bain-marie , agitation des flacons, récipients d'hydrolyse ...

#### I - Dosage du Codex : Activité protéolytique : Codex 1949 , page 536 :

*« Prenez 0,015 g. de papaine, 2,50 g. de fibrine de porc desséchée ( K ) et 50 ml. d'eau bidistillée .*

*Placez le tout dans un flacon à large ouverture de 90 ml . que vous maintiendrez dans un thermostat pendant deux heures, à la température de 70° , en agitant toutes les dix minutes environ .*

*Filtrez; 10 ml. de filtrat ne doivent pas se troubler à la température ordinaire, par addition de vingt gouttes d'acide nitrique officinal .*

*L'extrait sec, obtenu en opérant sur 10 ml. de filtrat, devra avoir un poids au moins égal à 0,300 g.*

*Ce filtrat, examiné au polarimètre, dans un tube de deux décimètres, devra donner une déviation minimum de - 3° .*

*Dans ces conditions, la papaine protéolyse cent soixante six fois son poids de fibrine sèche, ce qui correspond sensiblement à six cent soixante fois son poids de fibrine fraîche, ce que l'on exprime en disant que la papaine possède un titre de 660. (titre protéolytique).»*

Nous devons donc réaliser une agitation régulière des flacons d'hydrolyse, maintenus dans un bain-marie, à température constante.

#### II - Appareillage utilisé :

A) Thermostat : Nous avons vu que la digestion de la fibrine par la papaine était optimum à la température de 70° ( p.34)

Afin de voir avec quelle précision il convient de régler la température du bain-marie, nous étudierons l'influence de la température

sur l'hydrolyse de la fibrine par la papaïne .

|     |                    |          |
|-----|--------------------|----------|
| 10° | extrait sec réduit | 0 mg     |
| 10° | « . « . «          | 0 mg     |
| 22° | « . « . «          | 10,3 mg  |
| 45° | « . « . «          | 58,5 mg  |
| 65° | « . « . «          | 127 mg   |
| 70° | « . « . «          | 133,9 mg |
|     | « . « . «          | 134,1 mg |
| 75° | « . « . «          | 135 mg   |
| 80° | « . « . «          | 176 mg   |
|     | « . « . «          | 119 mg   |
|     | « . « . «          | 156 mg   |
|     | « . « . «          | 123 mg   |
| 85° | « . « . «          | 148 mg   |
|     | « . « . «          | 144 mg   |

Nous voyons qu'au delà de 75°, il est très difficile d'obtenir des résultats reproductibles . La dispersion des résultats obtenus est très grande, sans doute parce que la papaïne est plus ou moins détruite .

Nous avons transcrit ces résultats sur le graphique VIII .

D'après cette courbe, on voit qu'il suffit, pour la détermination du titre d'une papaïne, de disposer d'un bain-marie dont la température restera comprise entre 70° et 75° .

Mais, pour le tracé de la courbe précédente et pour toutes nos études ultérieures, nous avons cherché un thermostat, dont la température soit beaucoup moins variable .

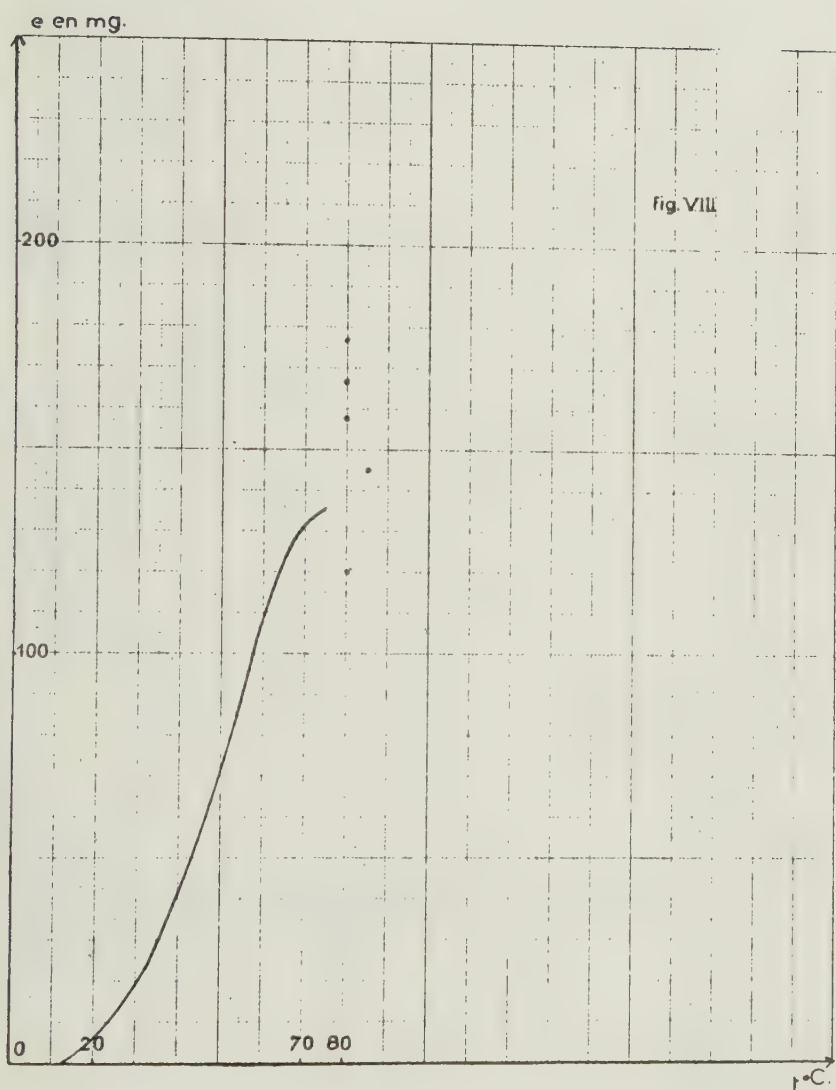
Notre premier essai comportait un bac en acier chromé, équipé d'un bilame réglable, incorporé dans les parois mêmes de la cuve et destiné à régler la température .

Cet appareil n'était pas assez précis et nécessitait une surveillance constante de la température, qui pouvait varier de deux degrés en plus ou en moins au cours d'une expérience .

Une telle tolérance peut, d'après ce que nous venons de voir, être admise pour une détermination courante du titre d'une papaïne par la méthode Codex, mais, dans notre étude, elle était, a priori, insuffisante .

Nous avons fait alors réaliser une simple cuve en acier inoxydable (1), aux dimensions nécessitées par notre système d'agitation .(.)

(.) Les numéros entourés d'un cercle correspondent à la figure VII.

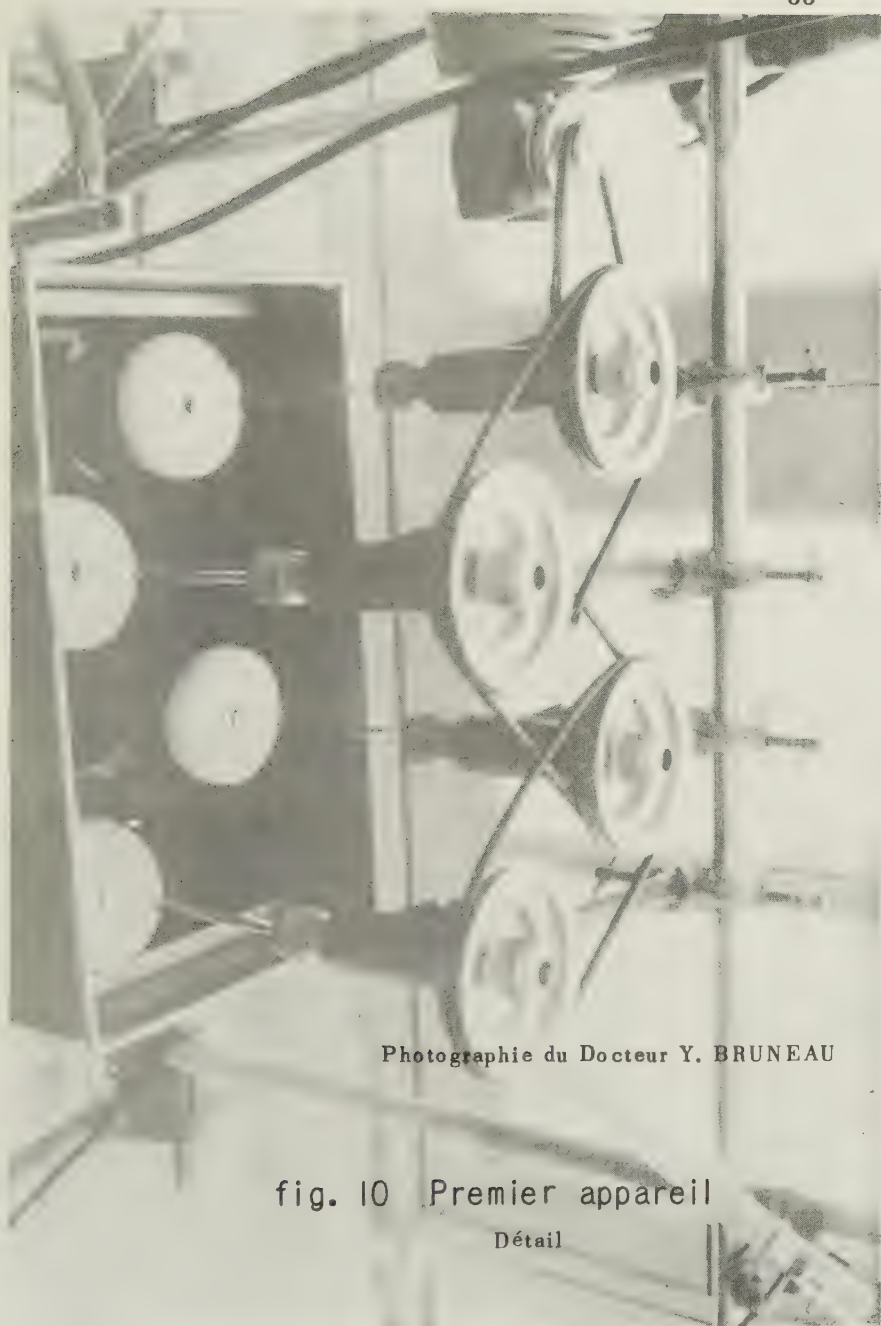




Photographie du Docteur Y.BRUNEAU

fig. 9 Premier appareil

Vue d'ensemble



Photographie du Docteur Y. BRUNEAU

fig. 10 Premier appareil

Détail



fig. II Appareil définitif

Vue d'ensemble



Photographie du Docteur Y. BRUNEAU

fig. 12 Appareil définitif

Détail

Ce bac repose sur quatre pieds cylindriques, pour éviter une fuite thermique trop importante. Grâce à un système de fixation sur la paroi de la cuve, nous avons placé, dans un angle du bain-marie, un appareil à régulation automatique; celui-ci comporte un thermomètre à contact (4), avec relais à transistors incorporé, et une pompe (5), qui permet un mouvement continu de l'eau.

Celle-ci est aspirée à travers un corps chauffant (6) et refoulée dans la cuve (1).

On assure ainsi un excellent brassage de l'eau et on obtient facilement une température homogène de 70° à 0,1° près. Nous avons pu vérifier cette constance de température en un point quelconque du bain à l'aide d'un couple thermoélectrique nickel - maillechort (fig. XIII). La courbe d'étalonnage de ce couple, tracée à l'aide des points d'ébullition et de congélation de différents liquides, est représentée sur la figure XIV.

Une mise en température rapide du bain est obtenue grâce à deux résistances supplémentaires de 500 watts chacune (8) qui sont mises hors de circuit quand la température moyenne désirée est atteinte.

La régulation de la température se fait uniquement par la résistance du thermostat, commandée par le thermomètre à contact.

Nous avons pu obtenir ainsi un fonctionnement rapide et précis de notre bain-marie.

Pour éviter une évaporation trop importante, nous avons enveloppé notre appareil d'une hotte en matière plastique (10) munie d'un aspirateur de buée (9). (cf. fig. XI).

Le couple thermoélectrique nous a permis également de vérifier la nécessité d'agiter les flacons au début et en cours d'expérience. Cette agitation a un double but :

- mettre en contact un mélange hétérogène de deux poudres insolubles dans l'eau ;
- diminuer le temps nécessaire de mise en équilibre de la température à l'intérieur des matras et régulariser les points de chauffe.

Nous avons constaté, à l'aide de ce dispositif, qu'il suffisait d'agiter pendant 4 à 5 minutes, en début d'expérience, pour obtenir la montée de la température de l'ambiance à 70°, à l'intérieur du matras.

Sans agitation, 15 minutes sont nécessaires pour obtenir ce même résultat. (fig. XV)

Photographie de CORNETTEAU  
fig. 13 Couple thermoélectrique

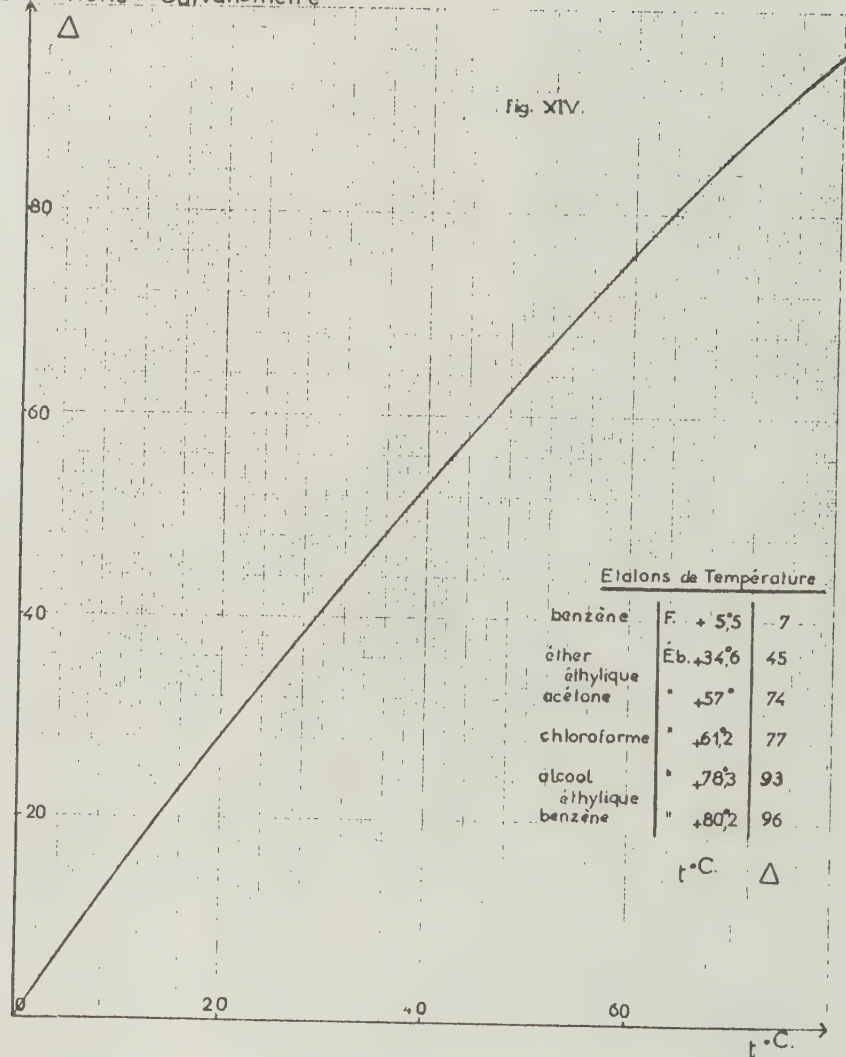
## Déviations du Galvanomètre

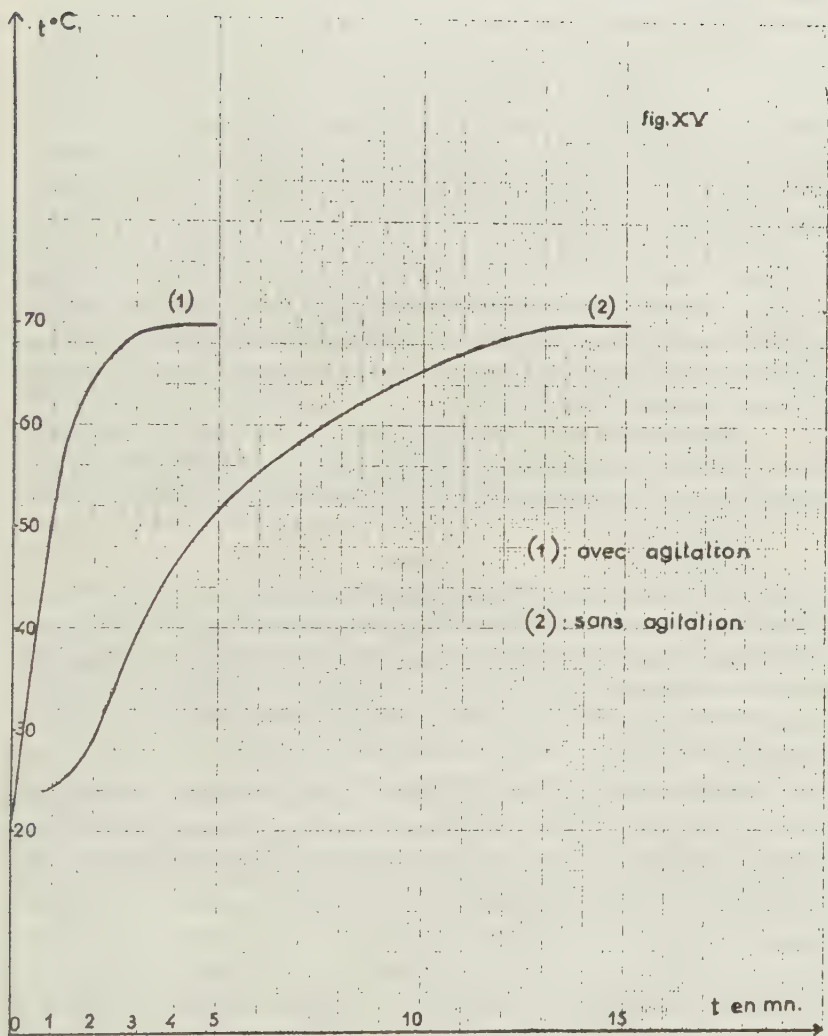
Fig. XIV.

## Etalons de Température

|             |            |    |
|-------------|------------|----|
| benzène     | F. + 5,5   | 7  |
| éther       | Éb. + 34,6 | 45 |
| éthylque    | " + 57°    | 74 |
| acétone     | " + 61,2   | 77 |
| chloroforme | " + 61,2   | 77 |
| alcool      | " + 78,3   | 93 |
| éthylque    | " + 78,3   | 93 |
| benzène     | " + 80,2   | 96 |

t°C. Δ





B ) Dispositif d'agitation : Agiter à la main est nécessairement imprécis, irrégulier en même temps que fastidieux; nous devons trouver un système d'agitation mécanique commandé par une minuterie électrique ou mécanique .

#### Système n° 1 :

En suivant les indications du Codex (22) , nous avons tout d'abord adopté les flacons d'hydrolyse à large ouverture ( Erlenmeyers) . Ceux-ci nous permettaient l'emploi d'agitateurs à ailettes en verre que nous introduisions directement dans le liquide d'hydrolyse . ( cf photo n° X) .

Mais le brassage du liquide dans ces erlenmeyers non bouchés avait pour conséquence une surface d'évaporation trop grande, surtout à la température de 70° . Dans ces conditions, le liquide d'hydrolyse de 50 ml au départ se réduisait à un filtrat de 15 ml. Le calcul normal de l'extrait sec total, en multipliant par 5 le résultat trouvé pour 10ml, devenait donc faux .

Nous devons donc effectuer cette hydrolyse en flacons hermétiquement clos . Un nouveau problème d'agitation se posait donc, le système d'agitation devant être désormais extérieur au flacon d'hydrolyse .

#### Système n° II :

Nous verrons plus loin comment nous sommes arrivée à adopter des matras de kjehldahl à bouchage émeri . (p.72 ) . A la suite de nombreux essais avec le matériel courant d'agitation au laboratoire, qui ne nous ont pas permis de réaliser une montée en température assez rapide ni une homogénéité du milieu réactionnel assez grande, nous avons été conduite à adopter le dispositif suivant :

L'agitation est obtenue en faisant tourner le matras sur lui-même en un mouvement conique . Un moteur entraîne quatre poulies par un système de courroies . Ces poulies comportent un tube axial et sont disposées au-dessus du bac selon le schéma suivant :



Une tige filetée en laiton passe au centre du tube axial. Quatre excentriques en bois commandés par ces tiges vont permettre la rotation des matras.

C ) Flacons d'hydrolyse : 1 : Nos premiers essais ont été effectués, comme l'in-

dique le Codex (22) , « dans des flacons de 90 ml. à large ouverture » . Nous avons choisi des erlenmeyers dans lesquels nous introduisions l'extrémité d'un agitateur à ailettes en verre, qui brassait périodiquement le mélange à hydrolyser . ( cf. p. 70 , système n° I ) .

Nous avons indiqué plus haut les inconvénients de ce premier choix (page 70 ) . L'évaporation intense en cours de dosage, suivie d'une filtration très lente, réduisait le filtrat obtenu à 15 ml., alors que l'on disposait au départ de 50 ml. d'eau distillée .

2 : Etant donné le système d'agitation alors adopté, le bouchage des erlenmeyers ne pouvait être totalement hermétique . Nous avons obtenu pourtant une première amélioration en adaptant des bouchons en polyéthylène sur les erlenmeyers. C'étaient de simples couvercles, percés d'un trou axial qui permet le passage de l'agitateur et emboîtés à force . ( cf. fig. X ) .

Une hydrolyse, effectuée dans de telles conditions, a été menée parallèlement à l'expérience que nous avons décrite dans le paragraphe précédent. Après filtration, dans des conditions analogues, on obtient un liquide d'hydrolyse voisin de 34 ml.

L'amélioration était nette, mais encore insuffisante. Il s'avèrait donc nécessaire d'effectuer l'hydrolyse en vase clos; ceci, en utilisant le système d'agitation n° II ( cf. page 70 ) .

3 : Nous avons pensé utiliser des matras de Kjeihldahl, dont le long col offrait plusieurs avantages : il pouvait être enserré par l'excentrique de notre second système d'agitation, l'eau évaporée se condensait facilement sur les parois du matras bouché . Il restait à trouver un bouchage suffisamment hermétique de ces matras :

- un premier essai a été fait avec des bouchons de liège ou de caoutchouc ; l'étanchéité était assez variable . Parfois même excellente puisque, en fin d'hydrolyse, il nous est arrivé de recueillir, après filtration, 41 ml de filtrat . Une expérience parallèle, effectuée à l'aide d'un ballon muni d'un réfrigérant à reflux rodé, soit dans les meilleures conditions possibles d'étanchéité, , nous a donné de même 41ml. de filtrat. Mais ces bouchons de liège fusaient souvent avec des projections de vapeur, quelquefois même de liquide . La température relativement élevée de l'expérience nous interdisait donc les bouchons de liège .

Nous avons adopté pour tous ces essais une pesée du matras avant et après expérience comme test de non évaporation .

- Nous avons alors appliqué ce test à différents bouchons hermétiques du commerce, généralement des bouchons à limonade, munis ou non d'ergots de retenue ;

des bouchons de caoutchouc emboîtants nous ont permis de réaliser pour la première fois une expérience sans perte d'eau (pesée du

matras avant et après hydrolyse : 439 g.) .

Mais ces bouchons risquaient de se détériorer par chauffage prolongé à 70° sans qu'il y ait de contrôle possible de cette altération, si ce n'est une pesée à chaque expérience ; nous devions éliminer cette éventualité pour un dosage pratique et simple .

- des bouchons métalliques ( à limonade ) , emboîtés à force et maintenus par une dizaine d'ergots, comportaient un joint de caoutchouc qui risquait de fuir .

- Nous avons alors essayé un bouchage « type cannette » . Un collier métallique enserre le col du matras, un étrier adapté sur le collier maintient un bouchon de porcelaine ( XVI ) . Un joint de caoutchouc assure, là encore, l'étanchéité et, par altération, laisse passer la vapeur d'eau qui fuse en bouillonnant .

Ce système de fermeture rend, de plus, les matras ainsi équipés fragiles .

#### - Système définitif : matras bouché émeri :

Nous avons fait un premier essai avec des flacons émeri du commerce. Mais les bouchons, de faible diamètre, fusaient par chauffage prolongé, à 70° .

Il fallait donc trouver un système de retenue du bouchon sur le matras .

De plus, nous désirions garder le principe du matras de Kjeihldahl . Or, il n'existe pas, à notre connaissance, de matras pour kjeihldahlisation bouchant émeri .

Nous en avons alors réalisés par simple travail du verre au chalumeau à oxygène, ceci en soudant la partie mâle d'un rodage émeri à la place du col du matras . Le rodage femelle correspondant a été étiré, puis arrondi, pour former un bouchon . De plus, nous avons soudé 4 ergots de verre : deux sur le matras, deux sur le bouchon ; ils permettent la mise en place de ressorts de retenue ou même de simples caoutchoucs jouant le même rôle .

De nombreuses expériences nous ont permis de vérifier l'excellente étanchéité du système ; les pesées du matras, avant et après hydrolyse, étaient rigoureusement identiques . Nous récupérons d'ailleurs régulièrement avec ce dispositif, 47ml. de filtrat sur les 50 ml. de départ, soit une perte de 6 % représentant l'eau fixée par le gâteau de filtration, le filtre et les parois du réipient .

Bien plus, la constance des titres ainsi déterminés est remarquable et les résultats trouvés par cette méthode, sont supérieurs à

fig. XVI



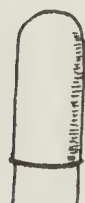
Essai



Essai



Essai

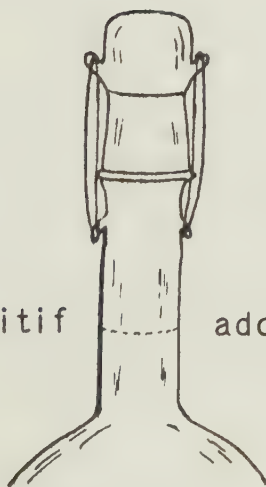


Essai



Essai

Dispositif adopté



ceux obtenus avec d'autres modes de fermeture . C'est ce que nous ont prouvé les expériences suivantes :

- bouchage cannette : extrait sec de 10 ml. : 104,6 mg, ce qui donne un titre de 139 ;
- bouchage émeri : extrait sec de 10 ml. de filtrat : 117,8 mg, ce qui donne un titre de 155,3 .

Nous avons adopté les matras de kjehldahl à fermeture émeri .

**D ) Filtration :** Le Codex indique de filtrer le mélange résultant de l'hydrolyse, sans préciser s'il s'agit d'une filtration à chaud ou à froid . Il semble vouloir indiquer de filtrer aussitôt l'hydrolyse effectuée, donc à chaud . Une telle filtration est généralement longue ( une heure au minimum et souvent plusieurs heures ) .

Il est difficile d'éviter l'évaporation au cours de cette opération ainsi qu'un refroidissement incontrôlable . Il en résulte des erreurs assez importantes sur le filtrat : erreur sur le volume, erreur sur les produits d'hydrolyse, car la protéolyse se poursuit en cours de filtration .

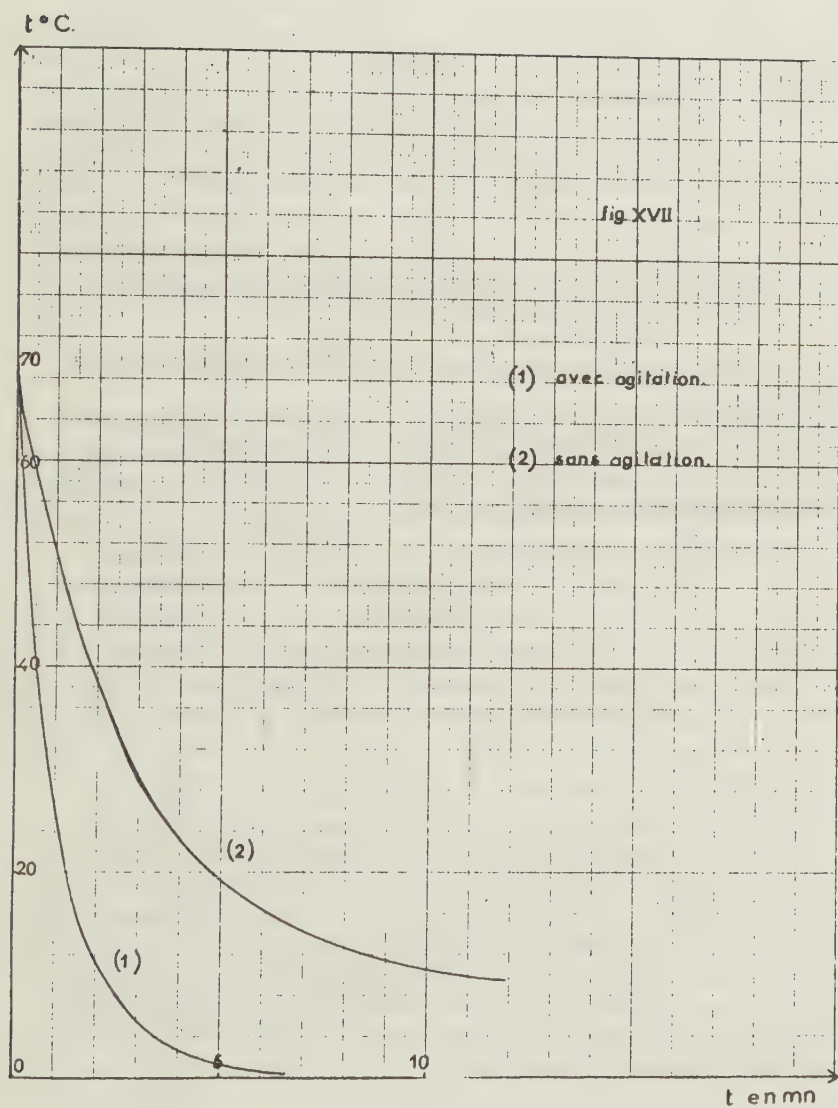
C'est pourquoi il nous semble préférable d'opérer à froid, en refroidissant le milieu réactionnel le plus rapidement possible après les deux heures d'hydrolyse indiquées par le Codex . (22) Il nous a paru très simple pour obtenir ce refroidissement rapide, d'immerger le matras dans un mélange d'eau et de glace, contenu dans un bécher de 3 à 4 litres. D'après la courbe d'influence de la température précédemment tracée, on voit qu'il suffit de descendre rapidement au-dessous de 10° pour arrêter le phénomène ( fig. VIII ) .

A l'aide du couple thermoélectrique précédemment décrit, nous avons pu montrer la nécessité d'agiter le matras continuellement pendant ce refroidissement . La figure indique que la température intérieure du matras descend de 70° à 10° en 2 minutes si l'on agite continuellement , 10 minutes si l'on n'agite pas. ( fig. XVII ) .

Nous avons essayé de séparer notre hydrolysate par centrifugation pendant 15 minutes à 6 000 tours/minutes, dans une centrifugeuse réfrigérée à 0° . Nous avons fait varier le temps de centrifugation, la vitesse de rotation, mais, en aucun cas, nous n'avons pu obtenir de résultats reproductibles. La centrifugation est donc à rejeter .

#### Filtre utilisé :

La filtration a pour but ici de séparer un mélange complexe de protéines non attaquées, de polypeptides et d'acides-amino . Ces particules sont souvent colloïdales, par conséquent, seules les molécules de petites dimensions passeront à travers les pores du filtre . Ceux-ci



étant de grandeur variable suivant les numéros de filtre employé, on doit préciser la porosité du filtre à utiliser. Sinon, la quantité de produits non retenus par le filtre variera ainsi que, par voie de conséquence, l'extrait sec mesuré.

BABIN préconise l'utilisation d'un double filtre SCHLEI-CHERSCHÜLL n° 622, (4) car il recherche l'obtention d'un liquide parfaitement clair, permettant une détermination aisée du pouvoir rotatoire.

Or, si on se sert d'une détermination d'extrait sec, la limpidité du filtrat n'est pas absolument nécessaire. Il suffit de pouvoir effectuer des prélèvements donnant des extraits secs reproductibles, aux erreurs de pesée près. ( $\neq$  0,2 mg.)

A la suite des travaux de BABIN (4), nous avons utilisé le filtre de DURIEUX n° 122 qui correspond à la porosité Schleicherschüll n° 622 préconisée par cet auteur.

Nous avons néanmoins essayé divers filtres courants de laboratoire.

Nous avons réalisé l'expérience suivante sur l'hydrolysate de 5 grammes de fibrine par 0,030 gramme de papaïne dans 100 ml. d'eau. Nous avons partagé notre filtrat en quatre parties que nous avons filtrées sur quatre papiers filtres différents :

|     |               |                   |               |          |
|-----|---------------|-------------------|---------------|----------|
| 1 : | papier n° 111 | - qualité bleue : | extrait sec : | 218,2 mg |
| 2 : | « 111         | - « blanche :     | « «           | 212,1 mg |
| 3 : | « 111         | « rouge :         | « «           | 221,6 mg |
| 4 : | « 122         | « orange :        | « «           | 242 mg   |

Nous concluons de ces essais qu'il faut normaliser le papier filtre à employer et se tenir à la qualité choisie.

Pour nos essais, nous avons adopté les filtres Durieux n° 122 ( bande orange ) .

Nous avons cherché à utiliser les creusets filtrants : ceux à porosité n° 1 et n° 2 donnaient un liquide plus ou moins trouble au cours de la filtration. Il était donc difficile, a priori, d'effectuer un prélèvement homogène sur le filtrat et d'obtenir des résultats reproductibles. Le numéro 3 conviendrait, mais la filtration est malaisée et, de plus, le creuset en lui-même est difficile à laver; on doit donc éliminer l'emploi de ces creusets. Notons que le creuset n° 4 a des pores trop fins et que le liquide ne filtre pas.

Prélèvement des 10 millilitres de filtrat :

A quel moment de la filtration doit-on prélever les 10 millilitres de liquide pour effectuer l'extrait sec ?

- au début, c'est-à-dire sur les 15 premiers ml. filtrés ;
- plus tard, en éliminant les 5 premiers ml. filtrés ;
- ou encore, en rejetant les 10 premiers ml. filtrés ,  
et en prenant 10 ml. sur les 15 ml. suivants ,
- enfin, sur le filtrat total ?

Quel que soit le filtre utilisé, nous avons vu que la filtration était très longue puisqu'elle demandait environ trois heures pour être totale . On ne peut mouiller le filtre pour obtenir une meilleure adhérence sans diluer les premiers millilitres du filtrat et fausser un dosage effectué sur ce prélèvement .

Pour pallier cette filtration trop lente, certains utilisateurs dosent la papaine en effectuant l'extrait sec sur les 10 premiers millilitres du filtrat.

Le Codex ne donnant aucune précision, c'est leur droit . Cette méthode est-elle acceptable ? Elle pourrait présenter deux inconvénients :

- premier inconvénient : si les filtres employés contiennent dans leur texture même des substances solu-

bles dans l'eau, celles-ci se retrouveront dans les 10 premiers millilitres du filtrat . Comme nous travaillons sur un extrait sec pesant environ 180 milligrammes, quelques milligrammes de surcharge peuvent fausser les résultats obtenus .

Pour voir si ce phénomène se produit, nous avons conduit l'expérience suivante :

nous avons mis dans un matras à hydrolyse 50 ml. d'eau « désionisée sur résines » ; nous avons porté le flacon dans un bain-marie à 70° pendant deux heures; puis nous avons filtré sur papier Durieux n° 122; nous avons évaporé 10 ml. du filtrat total à l'étuve à 100° dans un cristalliseur émeri taré :

résultats : tare : 53,374 g .

après évaporation : 53,374 g.

Ceci nous prouve d'ailleurs deux faits :

- 1) : l'eau désionisée sur résines échangeuses d'ions » a un extrait sec nul ou inférieur à 0,001 g. pour 10 ml. ;
- 2) aucune substance n'est extraite du filtre lors de la filtration .

- deuxième inconvénient : certains acides aminés ainsi que de petits colloïdes peuvent être fixés

par le filtre en voie de mouillage ; ceci risque de fausser le dosage lorsque l'on extrapole le résultat final à partir de la pesée obtenue avec les 10 premiers millilitres .

A partir d'une hydrolyse d'une fibrine LNCM par une papaine IBI<sup>1</sup>,

nous avons mené l'expérience suivante pour comparer les extraits secs des diverses parties du filtrat .

1 : extrait sec de 10 ml. prélevés sur les 15 premiers ml. de filtrat : 186,0 mg

2 : extrait sec de 10 ml. prélevés sur les 15 ml. suivants : 188,0 mg

3 : extrait sec de 10 ml. prélevés sur les 15 derniers ml. de filtrat : 190,8 mg

4 : extrait sec moyen

$$\frac{186 + 188 + 190,8}{3} = 188,20 \text{ mg.}$$

Nous voyons que l'extrait sec augmente régulièrement quand on passe des premiers aux derniers millilitres . Nous pensons que la filtration étant très lente, une réelle évaporation se produit à la température du laboratoire et peut expliquer cette augmentation de poids aussi bien qu'une adsorption sur le filtre en début de filtration.

Nous constatons cependant une différence de 4,8 mg. seulement pour une pesée moyenne de 188 mg. entre les divers extraits, soit une erreur maximale de  $\pm 2,5\%$  acceptable pour un tel dosage .

Pour des raisons de rapidité, nous prélèverons donc 10 ml. , à la pipette de précision, sur les quinze premiers millilitres de filtrat .

Nous avons vu qu'avec le dispositif de flaconnage recommandé, il ne manquait que 3 ml. de liquide après filtration totale . Comme l'expérience précédente nous montre que l'extrait sec de 10 ml. est pratiquement le même quel que soit l'instant du prélèvement, on peut admettre que ces trois millilitres ( qui ne sont jamais qu'un élément de correction ) présentent la même composition que le filtrat lui-même. Donc, l'extrait sec déterminé sur 10 ml. prélevés, comme nous l'avons dit, pourra être effectivement rapporté, sans erreur grave, à 50 ml., lors du calcul du titre .

#### E) Dessiccation des 10 millilitres de filtrat :

On prélève ces 10 millilitres à l'aide d'une pipette de précision. On les verse dans un cristalliseur bouchant émeri, que l'on a précédemment taré ( cristalliseur + couvercle ) . Ces cristalliseurs sont numérotés par des chiffres gravés.

Température de l'étuve : Nous avons étudié parallèlement la dessiccation à diverses températures et à froid dans le vide sulfurique .

Nous avons choisi deux températures d'essai : 100° , ( température habituelle d'obtention des extraits secs ) , 50° , ( cet essai nous avait été conseillé par Monsieur BABIN de Bordeaux ) :

- à 100° , nous obtenons un extrait sec jaune ;
- à 50° , celui-ci est blanc ;

mais les pesées correspondantes ne diffèrent pas :

- expérience effectuée : 10 ml. évaporés à 100° : 67 mg.  
5 ml. « 50° : 33,5 mg.

BABIN indique que l'on obtient un poids d' extrait sec identique aux précédents par dessiccation à froid dans le vide sulfurique .(4)

L'usage de l'étuve à 100° donnant des résultats beaucoup plus rapides et tout aussi précis, *nous adopterons une dessiccation à 100°.*

Nous remarquerons cependant que la méthode de dessiccation ne joue pratiquement pas sur le résultat final.

Au sortir de l'étuve, les cristallisoirs sont refermés et portés dans un dessiccateur à « Actigel » jusqu'à refroidissement complet avant la pesée.

### III - Réactifs utilisés

#### A) Fibrine de porc desséchée :

Le Codex de 1949, dans sa monographie de la papaine, indique : « prenez 2,50 g. de fibrine desséchée ( R ) » .

Celle-ci est décrite dans la liste des réactifs publiée page 1089 de ce même ouvrage : « c'est une poudre hygroscopique que l'on doit conserver en flacons paraffinés; la détermination de l'activité protéolytique au moyen de la fibrine doit être pratiquée sur de la fibrine dont on connaît la teneur en fibrine desséchée à 100° » . (22) .

En fait, ce que le Codex appelle fibrine desséchée et qu'il demande d'utiliser dans ce dosage est un produit « séché rapidement dans le vide ou dans une étuve chauffée à 40° » . (22) . Il n'indique même pas si cette dessiccation doit être menée à poids constant .

Par contre, le titre doit être rapporté à de la fibrine desséchée à 100° .

Pourquoi ces deux températures de dessiccation ?

Nous avons jugé bon de comparer ces divers modes de dessiccation menés jusqu'à poids constant . Puis, pour nous assurer que la fibrine n'a pas été dénaturée par ces divers traitements, nous avons soumis les échantillons ainsi desséchés à une même hydrolyse .

Nous étudierons comparativement la dessiccation à 100° , à 50° , à 40° et dans le vide sur « Actigel » , d'un échantillon de 2,500 g. de fibrine brute .

Nous établirons les courbes de dessiccation et nous observerons les paliers obtenus qui correspondent aux termes des dessiccations menées à poids constant ( fig. XV ) .

- 2,500 g. de fibrine brute donnent, par dessiccation à 100° ,

- un poids de fibrine desséchée de : 2,2767 g. , soit une teneur en eau de 0,2233 g. ;
- 2,500 g. de fibrine brute donnent, par dessiccation à  $50^{\circ}$  , un poids de fibrine desséchée de : 2,312 g. soit une teneur en eau de 0,188 g. ;
  - 2,500 g. de fibrine brute donnent, par dessiccation à  $40^{\circ}$  , un poids de fibrine desséchée de : 2,4011 g. soit une teneur en eau de 0,098 g. ;
  - 2,500 g. de fibrine brute donnent, par dessiccation sous vide sur « Actigel » et à la température du laboratoire , un poids de fibrine desséchée de : 2,320 g. soit une teneur en eau de 0,180 g.

L'hydrolyse des divers échantillons ainsi traités a donné les résultats suivants :

- fibrine desséchée à  $100^{\circ}$  + 15mg. de papaine IBF :  
extrait sec de 147,9 mg.
- fibrine desséchée à  $40^{\circ}$  + 15 mg. de papaine IBF :  
extrait sec de 170,9 mg.
- fibrine desséchée dans le vide + 15mg. de papaine IBF :  
extrait sec de 167,5 mg.
- témoin : 2,500 g. de fibrine brute non desséchée + 15 mg. de papaine IBF : extrait sec de 171 mg. .

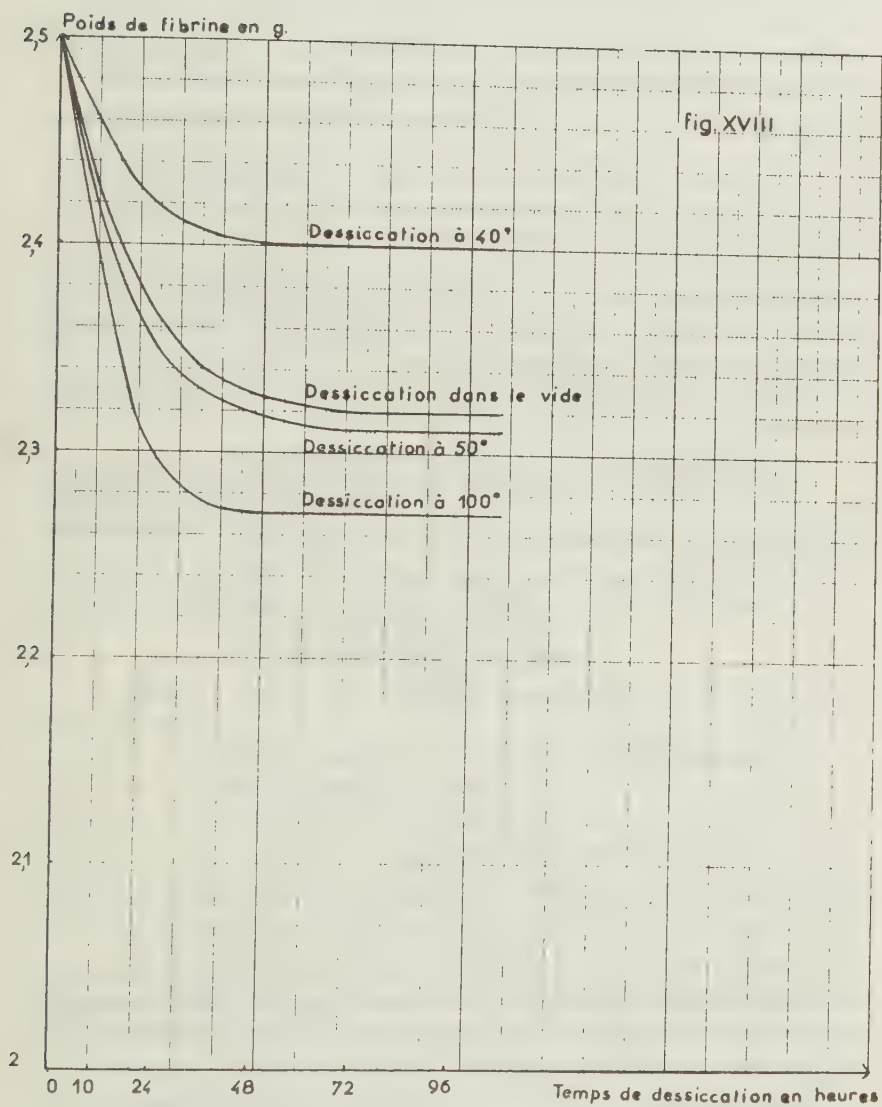
La dessiccation à  $40^{\circ}$ , recommandée pour la fabrication de la fibrine, n'altère effectivement pas cette substance puisque l'on retrouve le même taux d'hydrolyse par la papaine qu'avec le témoin . Par contre, cette dessiccation est assez longue et la perte d'humidité est environ 50 % de celle obtenue à  $50^{\circ}$  ou sous vide .

Les deux modes de dessiccation (  $40^{\circ}$  et sous vide ) laissent la fibrine à peu près inaltérée .

Par contre, la dessiccation à  $100^{\circ}$  altère profondément la fibrine puisqu'on ne retrouve à l'hydrolyse que 86 % des produits hydrolysés. D'autre part, il n'y a pas de raison particulière de choisir cette température de  $100^{\circ}$  , bien qu'elle donne ainsi une perte plus importante ; en effet, en portant la fibrine à une température encore plus élevée, on aura une perte de poids encore plus grande, mais un produit encore plus dénaturé .

Il semble donc plus logique d'appeler fibrine desséchée le produit obtenu par dessiccation à poids constant de cette substance, soit dans le vide, soit à  $40^{\circ}$  .

La fibrine étant très hygroscopique, il est nécessaire de déterminer cette humidité à chaque ouverture d'un flacon et, pour contrôle , de temps en temps, dans un même lot conditionné , ou mieux, de se



servir uniquement de fibrine très récemment desséchée à 40° ou dans le vide .

On aura intérêt à conserver la fibrine dans de petits flacons et toujours dans les mêmes conditions de température et d'humidité .

Nous avons conservé nos échantillons de fibrine pendant un an et demi, en flacons paraffinés maintenus à la glacière à - 4° ; leur taux d'humidité n'a pratiquement pas varié dans ces conditions .

Dans notre dosage, il faut évidemment tenir compte de cette humidité .

La solution la plus logique consiste à dessécher la fibrine à 40° ou dans le vide et à peser 2,500 g. de la fibrine ainsi desséchée . C'est aussi la méthode la plus précise .

En effet, nous verrons dans l'étude de l'influence des proportions relatives de fibrine et de papaïne, que nous travaillons dans une région où le taux d'hydrolyse varie assez rapidement avec la concentration de la papaïne par rapport à la fibrine .

Il y a donc intérêt à ce que celle-ci soit définie le plus exactement possible .

Solubilité partielle de la fibrine . Les expériences suivantes nous ont permis de constater que, pour une même papaïne, les résultats de l'hydrolyse varient avec la fibrine utilisée :

- expérience n° 1 :  $\left\{ \begin{array}{l} 0,015 \text{ g. de papaïne IBF} \\ 2,500 \text{ g. de fibrine LNCM} \\ 50 \text{ ml. d'eau} \end{array} \right.$   
titre obtenu : 365,5

- expérience n° 2 :  $\left\{ \begin{array}{l} 0,015 \text{ g. de papaïne IBF} \\ 2,500 \text{ g. de fibrine C.} \\ 50 \text{ ml. d'eau} \end{array} \right.$   
titre obtenu : 500,3

soit une différence de titre de 134,8 unités, soit 26,8% entre les dosages effectués avec deux fibrines de porc dites « étalons » .

Nous avons recherché les raisons de cette différence et nous avons déterminé les solubilités possibles de ces deux fibrines dans les conditions mêmes du dosage, soit les essais à blanc suivants :

et  $\left\{ \begin{array}{l} 2,500 \text{ g. de fibrine LNCM} \\ 50 \text{ ml. d'eau} \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{portés à la température} \\ \text{de } 70^{\circ} \text{ pendant 2 heures ;} \end{array} \right.$   
 $\left\{ \begin{array}{l} 2,500 \text{ g. de fibrine C.} \\ 50 \text{ ml. d'eau} \end{array} \right.$

On effectue alors l'extrait sec de 10 ml. des deux filtrats obtenus à partir de ces deux expériences parallèles : on obtient :

- fibrine LNCM : 167,5 mg.
- fibrine C. : 275 mg.

Nous avons établi, d'autre part, que 2,500 g. de fibrine LNCM perdaient # 220 mg. d'eau à 100°, et que 2,500 g. de fibrine C. perdaient # 121,2 mg. d'eau à 100°.

Les extraits secs obtenus dans les expériences ci-dessus 1 et 2 sont respectivement de :

- 1,380 g. pour 50 ml. de filtrat n° 1 ( fibrine LNCM )
- 1,897 g. pour 50 ml. de filtrat n° 2 ( fibrine C. )

Il est bien évident que la partie soluble de la fibrine, constante pour un lot de fibrine donné, vient fausser la détermination de l'extrait sec que l'on croyait constitué uniquement par les produits d'hydrolyse de la fibrine par la papaïne. Nous aurons ainsi un extrait sec réel, dû à l'action de la papaïne et un extrait sec global qui comprendra également la partie soluble de la fibrine. Nous avons cru bon de calculer les extraits secs réels pour ces deux expériences n° 1 et n° 2 :

- n° 1 : extrait sec réel :  $1,380 - 0,1675 = 1,2125$  g. ;  
ce résultat a été obtenu à partir de 2,500 g. de fibrine LNCM non desséchée, ce qui correspond à :

$$2,500 - 0,220 = 2,280 \text{ g. de fibrine desséchée ;}$$

l'extrait sec réel que l'on obtiendrait avec 2,500 g. de fibrine LNCM desséchée au lieu de ces 2,280 g. serait de :

$$\frac{1,2125 \times 2,500}{2,280} = 1,330 \text{ g.}$$

- n° 2 : l'extrait sec réel calculé de la même façon donne le résultat suivant :

$$\text{extrait sec réel : } 1,897 - 0,175 = 1,722 \text{ g.}$$

cet extrait a été trouvé pour :

$$2,500 - 0,121 = 2,379 \text{ g. de fibrine C. desséchée ;}$$

l'extrait sec correspondant à 2,500 g. de fibrine C desséchée est de :

$$\frac{1,722 \times 2,500}{2,379} = 1,805 \text{ g.}$$

-Ce calcul nous permet de voir que, malgré les corrections dues à la teneur en eau et à la solubilité différentes de ces deux fibrines, nous sommes loin d'avoir les mêmes résultats ; l'écart est de 26,3% lors de l'hydrolyse d'une même papaïne sur ces deux fibrines.

Il est donc nécessaire de bien choisir cette fibrine. D'où peut provenir cette différence ? On est réduit aux hypothèses sur les différences de qualité de ces diverses fibrines dites « étalons ». Vraisemblablement, ces différences résultent de purifications plus ou moins poussées.

Il faut remarquer que la fibrine C., qui s'hydrolyse plus facile-

ment que la fibrine LNCM renferme aussi plus de produits solubles . Sans doute, ceux-ci correspondent-ils à des amino-acides ou à des albuminoïdes de bas poids moléculaire qui peuvent subsister par suite d'un lavage insuffisant .

Nous avons pu vérifier la présence d'acides aminés par l'essai suivant :

- nous avons porté 2,500 g. de fibrine LNCM dans 50 ml. d'eau à 70° , pendant une heure . Au bout d'une heure, nous avons refroidi brusquement, puis nous avons effectué une formoltitration du liquide obtenu . La consommation de soude N/10 a été de 7,9 ml. .

Il nous paraît donc souhaitable d'imposer des normes à la fibrine dans cet essai ( par exemple, un extrait soluble déterminé ) .

Il nous paraît plus indiqué d'utiliser toujours la même fibrine, par exemple, celle du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments ( LNCM ) . Nous avons pu vérifier que cette fibrine avait toujours sensiblement le même extrait sec soluble dans les conditions de l'expérience. Cet extrait sec est inférieur à 170 mg. au total ( soit pour 2,500 g. de fibrine soumis à cet essai à blanc ) .

Nous proposons donc de faire un réel essai à blanc par lot homogène de fibrine employé :

- porter  $\left| \begin{array}{l} 2,500 \text{ g. de fibrine} \\ 50 \text{ ml. d'eau} \end{array} \right.$

à 70° pendant deux heures ; filtrer, faire l'extrait sec de 10 ml. de filtrat .

- on pourrait imposer à une fibrine étalon une teneur en produits solubles maximale : par exemple  $e \leq 170 \text{ mg.}$

Il est important de tenir compte de cet extrait sec dans le calcul du titre . En effet, si, pour une fibrine LNCM et une papaïne donnée, on a un extrait sec total de poids E ( pour 50 ml. de filtrat ) , celui-ci se compose, nous l'avons vu, des 0,1675 g. de produits solubles contenus dans cette fibrine et du poids e des produits solubles d'hydrolyse résultant de l'attaque de la fibrine par la papaïne :

$$E = e + 0,1675 \text{ ( en g. )}$$

d'où e , qui, seul , est spécifique de l'activité d'une papaïne et qui permet de calculer son titre, est égal à :

$$e = E - 0,1675 \text{ ( en g. )}$$

- Nous admettons ici que l'extrait sec soluble de la fibrine non hydrolysée est constitué principalement de produits chimiques non attaquables par la papaïne ( amino-acides simples, sels minéraux ) .

D'ailleurs, même si E renferme des peptides solubles attaquables par la papaïne, l'augmentation de poids qui en résulte sur e provenant de cette hydrolyse est très faible et négligeable devant les

autres causes d'erreur .

Puisque F est voisin de 0,900 g. , la correction des 0,1675 g. est importante (  $\neq 18\%$  ) . Nous reviendrons sur ce problème lors du calcul du titre .

Nous appellerons e l'extrait sec réduit ou extrait sec réel, caractéristique d'une papaine donnée dans les conditions du dosage .

Donc, une fibrine de même origine donne toujours la même quantité de produits d'hydrolyse solubles lorsqu'elle est soumise à la même papaine . Mais on doit déterminer, à chaque nouveau lot homogène de fibrine, la partie soluble de cette substance -test dans les conditions du dosage .

B) Suc de papayer, papaine, préparations papainiques à doser :

a) Si l'on dispose d'un échantillon de plusieurs grammes de suc de papayer se présentant en vermicules diversement colorés, on devra broyer ce suc, soit au mortier, couvert de préférence, soit dans un appareil mécanique ( broyeur , mélangeur ) .

Nous avons pulvérisé du suc de papayer de Ceylan dans « l'appareil polyvalent pour l'officine » ( . ) à 8000 tours par minute . Et ainsi, à partir de fragments irréguliers bruns, jaunes et blancs , nous avons obtenu une poudre homogène , blanc-crème , aussi fine que la fibrine puisqu'elle passe, elle aussi, au tamis module 26 . Nous avons pu prélever à volonté sur cette poudre des échantillons corrects de 15 mg.

Nous avons vu que la coloration des suc pouvait provenir d'un début de putréfaction, donc d'une altération en cours de dessiccation ; il n'est donc pas question de prélever au hasard quelques vermicules et de les broyer grossièrement .

b) De même, une poudre de papaine, d'apparence homogène, doit être vigoureusement agitée, tamisée si nécessaire, ou même, à nouveau, pulvérisée .

c) Les préparations ou spécialités contenant du suc de papayer doivent pouvoir être soumises à ce même dosage .

Nous avons dosé une spécialité anthelminthique dont le fabricant donne la formule suivante :

|                                    |                                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| « suc de papayer traité : 9 g.     | } pour une dose divisée en<br>3 sachets égaux . » |
| chlorhydrate de cystéine : 1,35 g. |                                                   |
| sucré aromatisé                    |                                                   |
| atomisé de réglisse                |                                                   |

(.) Cet appareil a été décrit dans la Thèse de Doctorat d'Université soutenue à Nantes par Mr DE HAYNIN de BRY.

Là encore, il faudra agiter et homogénéiser le mélange avant tout prélèvement et en prendre une quantité telle qu'elle représente 15mg de suc de papayer.

Pour une prise d'essai de 20 mg. nous avons obtenu 0,1285 g. d'extrait sec pour 10 ml. de filtrat; nous en avons déduit le titre de cette préparation :

$$\frac{128,5 \times 5 \times 4}{15} = 171.$$

### C) Pesée de la papaïne et de la fibrine :

Lorsque nous étudierons la courbe d'action de masse de la réaction papaïne - fibrine ( variation de l'extrait sec en fonction de la quantité de papaïne que l'on fait agir sur un poids constant de fibrine : 2,50 g) nous verrons que la pesée de 15 mg de papaïne se situe dans la partie presque rectiligne de la courbe, soit avec une pente très importante . (fig. XXV , page 107) .

C'est ainsi que 15 mg de papaïne donnent un extrait sec réduit de 136,5 mg ; cinq milligrammes en plus ou en moins donnent les résultats d'hydrolyse suivants :

- (1) : 10 mg. → 118 mg. d'extrait sec réduit
- (2) : 15 mg. → 136,5 mg.                    «
- (3) : 20 mg. → 152 mg.                    «

soit une différence de 34 mg. entre (1) et (3) ; en un autre point de la courbe, nous aurons :

- (1') : 125 mg. → 312 mg. d'extrait sec réduit
- (2') : 130 mg. → 315 mg.                    «                    «
- (3') : 135 mg. → 318 mg.                    «                    «

soit une différence de 6 mg. entre (1') et (3') ; Une même erreur absolue de 5 mg. sur la pesée du ferment entraîne une erreur absolue sur l'extrait sec beaucoup plus grande dans le premier cas que dans le second .

Erreur sur la pesée de papaïne : Nous verrons que l'équation de la courbe représentative de la loi d'action de masse de la réaction papaïne - fibrine est sensiblement de la forme : ( p. 110)

$$y = A x^{1/3}$$

y : extrait sec en milligrammes ,

x : quantité de papaïne en milligrammes

A : constante

$$\frac{\Delta y}{y} = \frac{1}{3} \frac{\Delta x}{x}$$

Si nous nous imposons une erreur relative  $\Delta y$  maximale de 2,5% sur l'extrait sec  $y$  et si nous admettons que la principale source d'erreur réside dans la précision de la pesée de papaine, nous devons avoir :

$$\frac{\Delta x}{x} \leq \frac{3 \times 2,5}{100}$$

soit :

$$\frac{\Delta x}{x} \leq \frac{7,5}{100}$$

Si l'on veut conserver la pesée de 15 mg., comme l'indique le Codex, une balance au 1/2 mg. suffit .

En effet :

$$\frac{\Delta x}{15} \leq \frac{7,5}{100}$$

se traduit par :

$$\Delta x \leq \frac{112,5}{100}$$

soit :

$$\Delta x \leq 1,125 \text{ mg.}$$

Dans nos essais, la pesée de papaine a été faite avec beaucoup plus de précision car d'autres causes d'erreur peuvent intervenir . Nous avons utilisé une balance de précision au 1/10ème de milligramme .

Récipient de pesée : Comment et dans quel récipient effectuer cette pesée pour être sûr de récupérer

la totalité du produit ?

Les données sont assez délicates : la papaine et le suc de papayer pulvérisé se présentent sous forme d'une poudre légère, très fine , impalpable . La fibrine a également une densité assez faible et nous devons en peser 2,500 g. Le récipient de pesée devra donc être d'un volume assez grand .

Nous pouvons réunir ces deux poudres dans un même récipient de pesée sans inconvénient et nous devons les verser intégralement dans le matras de réaction.

Nous pèserons d'abord avec précision la papaine, puis nous la recouvrons de fibrine, que nous aurons pesée au préalable au trébuchet et que nous amènerons au poids exact à la balance de précision.

Nous allons décrire rapidement nos essais de pesée puis le tube rodé émeri que nous avons finalement adopté .

1) Papier glacé taré : On fait sur papier glacé deux pesées successives: une de papaine, une de fibrine; on verse les deux poudres ainsi pesées dans le matras en évitant d'en

déposer sur le col du matras, sinon elles ne pourraient pas entrer en contact avec le liquide d'hydrolyse .

- Nous nous heurtons ici aux difficultés inhérentes à la nature de ces deux poudres : elles sont impalpables et volent au moindre souffle d'air; elles adhèrent au papier et ne peuvent s'en détacher complètement . D'où une perte de substance, grave s'il s'agit de papaine, et qui ne justifie plus l'utilisation d'une balance de précision .

2) Sabot de verre taré : On utilise une coupelle de verre en forme de sabot; celui-ci possède une ouverture latérale ( fig. XIX ) qui permet de verser les poudres directement dans le col du matras, puis de laver ce récipient avec les 50 millilitres d'eau à utiliser .

- Malgré ce lavage, une petite quantité de poudre reste adhérente aux parois du sabot, quelques gouttes d'eau également ( on peut les évaluer à 1 ml. environ ) . Nous avons fait l'expérience suivante : nous avons taré un sabot, puis, après avoir versé les poudres et lavé avec les 50 ml. d'eau, nous l'avons séché à l'étuve , puis pesé à nouveau . Nous avons pu constater qu'il restait sur ses parois :

$$42,9701 - 42,9673 = 0,00279 \text{ g.}$$

soit environ 2,8 mg. de poudre . ( > 1,125 mg. cf .p.87 ) . Cette erreur est importante si le résidu est constitué de papaine seule puisque la tolérance sur la pesée est de 1,125 mg.

Cette méthode est donc, dans notre utilisation particulière, à rejeter .

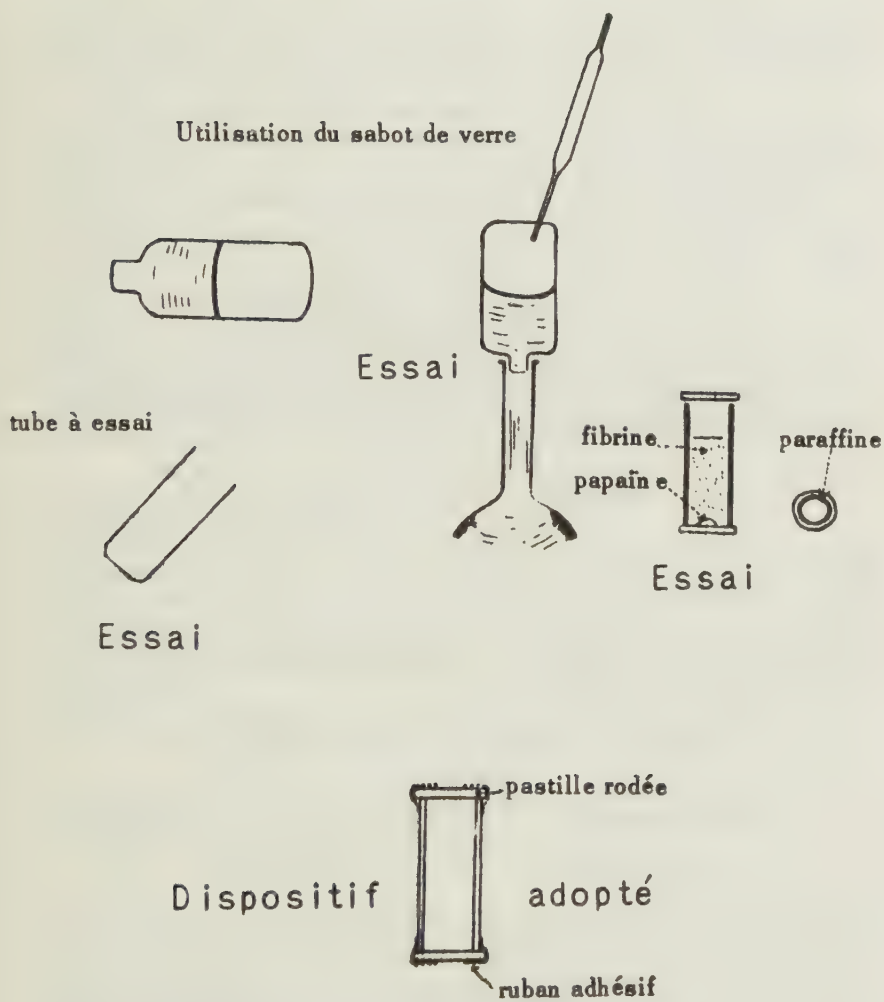
3) Tube à essai coupé à la longueur voulue, et taré : Nous nous sommes inspirée de la méthode de HANUS dans laquelle la prise d'essai d'huile pour la mesure de l'indice d'iode se fait dans un tube à essai.

Le diamètre intérieur du col de notre matras de Kjeldahl est de 18mm.; nous pouvons donc faire pénétrer un tube à essai ordinaire à l'intérieur du matras . Nous sectionnons ce tube à la longueur convenable pour qu'il puisse pénétrer complètement dans le matras et pour qu'il se place en position horizontale dans la partie renflée du Kjeldahl . Ce tube ainsi placé pourra baigner dans les 50 ml. du liquide d'hydrolyse et l'agitation intermittente, communiquée au matras par le système mécanique précédemment décrit, permettra aux poudres de se répandre dans tout le matras.

Le tube employé ne devra donc pas dépasser 5 cm de long pour pouvoir être amené dans cette position .

Ainsi, serons-nous sûre que, par cette méthode de pesée propre et rapide, toute la papaine et toute la fibrine seront amenées à l'intérieur du flacon d'hydrolyse .

fig. XIX



De plus, nous pouvons obturer, à l'aide d'un ruban adhésif, l'orifice du tube, placer celui-ci dans un dessiccateur que l'on peut porter dans un frigidaire. Nous conserverons ainsi, en cas de besoin, les pesées sans altération.

Pourtant, nous avons pu observer qu'une fois l'hydrolyse terminée, nous retrouvions au fond du matras ce tube de pesée obstrué par un bouchon de fibrine et de papaïne de dimension variable.

Des agglomérats de fibrine peuvent donc se former; s'il n'y a pas de papaïne au voisinage, ils peuvent échapper à la réaction et le dosage restera faussé.

De plus, la fibrine étant difficilement mouillable, l'eau, qui sert à mettre en contact ces deux poudres insolubles, cheminera mal dans ce tube ouvert à une seule extrémité.

Nous avons essayé de pallier cet inconvénient en vidant le tube dans le matras, en le rinçant avec quelques millilitres d'eau que l'on verse dans le Kjeldahl, puis en le faisant tomber dans le flacon d'hydrolyse. Mais, en fin d'expérience, nous retrouvions toujours le même agglomérat au fond du tube de pesée.

4) Tube de verre ouvert aux deux extrémités et rodé : Nous avons coupé des tubes de verre de diamètre extérieur 15 à 16 mm. Puis, nous avons rodé à l'aide d'une meule émeri les deux extrémités de ce tube. Enfin, nous avons découpé des plaques de verre de diamètre (15 + 1,5 mm) et nous les avons rodées sur les bords de façon à obtenir des pastilles régulières et sur les faces pour une meilleure adhérence.

Nous disposons désormais d'un tube ouvert aux deux extrémités rodées, et de deux pastilles de verre rodées pour le fermer.

Fermeture de ce tube : Le problème de la fermeture hermétique de ce tube s'est alors posé, pour la conservation entre deux expériences par exemple.

- Nous avons d'abord songé à l'emploi d'une mince couche de paraffine que nous disposions sur le pourtour des pastilles et qui permettait une excellente adhérence. Ce système avait, en outre, l'avantage de permettre une ouverture du tube à l'intérieur même du matras au moment de la réaction, lorsque le flacon d'hydrolyse était porté dans le bain-marie.

Mais, nous nous sommes aperçue que cette très faible quantité de paraffine suffisait pourtant à former un film à la surface du liquide d'hydrolyse. Ceci devait englober les grains de fibrine et les rendre moins mouillables, de même que les grains de papaïne. D'où des résultats de dosage très inconstants.

- Nous avons alors adopté le système de fermeture suivant : une simple bande de ruban adhésif est disposée autour de la base du tube et rabattue sur la surface de la pastille. Nous pesons la papaïne, puis la fibrine dans ce tube . Puis, nous adaptons de même la seconde pastille .

Nous obtenons ainsi un tube hermétiquement clos contenant les pesées et que l'on peut conserver plusieurs jours dans un dessiccateur maintenu à  $-4^{\circ}$  au frigidaire .

Cette méthode est, certes, délicate, mais nous avons essayé d'autres méthodes, qui se sont révélées très inférieures . En particulier, une solubilisation de la papaïne qui aurait facilité le prélèvement de la prise d'essai d'enzyme . Dans ce cas, il n' y aurait plus à effectuer qu'une pesée globale de papaïne pour faire une solution-mère et une pesée moins précise de fibrine .

Pour étudier ce problème, nous avons réalisé l'expérience suivante :

- nous avons pesé 15 mg. de papaïne que nous avons laissés plusieurs heures au contact de 15 ml. d'eau ; nous avons filtré et complété le filtrat à 50 ml. ; ceci nous a donné le liquide I ;

- une nouvelle extraction menée de même nous a donné le liquide II ;

- il restait un culot de poudre non solubilisée que nous appelons III ;

- nous avons mené 4 hydrolyses parallèles de 2,50 g. de fibrine avec les liquides I , II , le culot III et un témoin de 15 mg. de papaïne non solubilisée .

- Si l'on note les résultats en extraits secs réduits, on obtient :

|     |                                  |            |
|-----|----------------------------------|------------|
| I   | extrait sec de 10 ml. de filtrat | : 66 mg,5  |
| II  | «        «        «        «     | : 0 mg.    |
| III | «        «        «        «     | : 4 mg,5   |
| IV  | «        «        «        «     | : 146 mg,5 |

Ceci prouve que l'extraction, même prolongée, n'est pas suffisante pour obtenir la mise en solution de la totalité de la papaïne .

La pesée de la papaïne, telle que nous l'avons pratiquée, même si elle est plus délicate, est donc nécessaire .

#### D ) Eau : 50 millilitres :

Le Codex indique l'emploi d'eau bidistillée . Celle-ci est-elle vraiment nécessaire ? Nous avons essayé successivement l'eau

distillée ordinaire, et l'eau « épurée sur résines échangeuses d'ions » .

1 - L'eau distillée ordinaire : Son utilisation dans ce dosage est à rejeter, car elle renferme souvent des traces de cuivre provenant de l'alambic et nous avons vu que des traces de cuivre suffisaient à inhiber totalement la papaine ( cf. p.37 ).

2 - L'eau épurée sur résines échangeuses d'ions : L'eau du servi ce d'eau passe sur une colonne remplie de « résines échangeuses d'ions » ; après cheminement lent, elle est recueillie dans un baril en verre « pyrex » .

Nous pensons que, pour pouvoir être adoptée, cette eau devra répondre aux essais suivants ( ceux de l'eau bidistillée ) :

a) extrait sec nul : par évaporation de 10 millilitres d'eau dans un cristalliseur taré, nous avons prouvé page 77 qu'une eau ainsi préparée donne un extrait sec nul ;

b) la recherche du cuivre à la diéthylamine et au sulfure de carbone doit être négative ;

c) la recherche du plomb à la diphénylthiocarbazone doit être négative .

L'eau « épurée sur résines échangeuses d'ions » répondant à ces tests, nous l'avons utilisée à la place de l'eau bidistillée dans ce dosage .

÷  
÷       ÷  
÷

## Chapitre IV

---

### ETUDE DE LA REACTION SUBSTRAT -PAPAINÉ

#### A) FIBRINE

## ETUDE DE LA REACTION SUBSTRAT - PAPAINE

### A) FIBRINE

Pour justifier les conditions opératoires de ce dosage et préciser un mode de calcul du titre des papaines, nous avons étudié la réaction mise en jeu.

Tout d'abord du point de vue cinétique, nous avons suivi la progression du poids d'extrait sec en fonction du temps, les proportions de fibrine et de papaine étant maintenues constantes.

Puis, pour l'étude de l'action de masse, nous avons fait varier la quantité de papaine en utilisant toujours la même quantité de fibrine ( 2,500 g. ) et en fixant le temps d'hydrolyse à deux heures.

Nous rappelons que, à la suite de divers auteurs, nous pensons que la température de 70° est convenablement choisie ( cf. courbe de température page 61 fig. VIII ), et qu'il n'y a pas lieu de tamponner le milieu.

#### I- Influence du temps d'hydrolyse, les concentrations relatives de fibrine et de papaine étant maintenues constantes :

Nous maintiendrons la température du bain-marie à 70°, à 0,1° près, à l'aide de l'appareillage précédemment décrit ; le pH et tous les autres facteurs physico-chimiques ne varieront pratiquement pas. La filtration et la détermination de l'extrait sec se feront de façon normalisée, comme nous l'avons indiqué plus haut. ( cf. pages 74 à 79 ).

Nous suivrons l'intensité de l'hydrolyse par les variations de pesée des extraits secs de 10 ml. de filtrat. Notre but principal est de rechercher le temps minimum d'hydrolyse nécessaire.

Nous disposons dans notre appareillage de quatre postes d'agitation ; il nous est donc facile de placer au départ quatre matras contenant chacun :

$$\left\{ \begin{array}{l} 0,015 \text{ g. de papaine I.B.F.} \\ 2,500 \text{ g. de fibrine LNCM} \\ 50 \text{ ml. d'eau « purifiée sur résines »} \end{array} \right.$$

Nous sortirons chaque matras du bain-marie au bout du temps convenable que nous aurons chronométré ; nous arrêterons l'hydrolyse par une immersion du matras dans un mélange d'eau et de glace et une agitation de 2 minutes dans ce bain, procédé que nous avons décrit page 75.

Nous étudierons ainsi l'hydrolyse obtenue au bout des temps suivants :

15 mn. , 30 mn. , 60 mn. , 90 mn. , 100 mn. , 120 mn. , 150 mn.

Nous aurons ainsi, en fonction du temps, les poids d'extraits secs réels obtenus . Et nous pourrons tracer la courbe cinétique d'hydrolyse à partir de ces résultats .

Mais, nous avons vu que la fibrine donnait elle-même un extrait sec dans les conditions du dosage : de 33,5 mg pour 10 ml. de filtrat, soit au total de 167,5 mg. .

Nous avons défini, page 85, ce que nous appelons extrait sec réduit e :

$$e = E - 167,5 \text{ mg.}$$

E étant l'extrait sec réel obtenu .

En reportant nos résultats en extraits secs réels et réduits, nous traçons les courbes correspondantes ( fig.XX page 96 ) .

| Temps en mn.      | 15   | 30    | 60    | 90    | 100   | 120   | 150   |
|-------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Extrait réel      | 84,5 | 114,5 | 149,5 | 165,5 | 169,5 | 176   | 179,5 |
| Extrait réduit    | 51   | 81    | 116   | 132   | 136   | 142,5 | 146   |
| Titre non corrigé | 102  | 154   | 197   | 220   | 226   | 234,6 | 241   |
| Titre corrigé     | 70   | 108   | 151   | 176   | 184   | 190   | 199   |

#### A) Evaluation du titre d'une papaïne :

Nous avons vu que le titre protéolytique d'une enzyme est le nombre de fois son poids de fibrine fraîche ( ou sèche ) qu'elle peut peptoniser dans des conditions déterminées par le Codex. ( deux heures d'hydrolyse ).

Nous voyons que 10 ml. de filtrat donnent en 2 heures d'hydrolyse : 0,176 g. d'extrait sec ;

50 ml., soit le filtrat total, correspondent donc à :

$$0,176 \times 5 = 0,880 \text{ g. de produits solubles.}$$

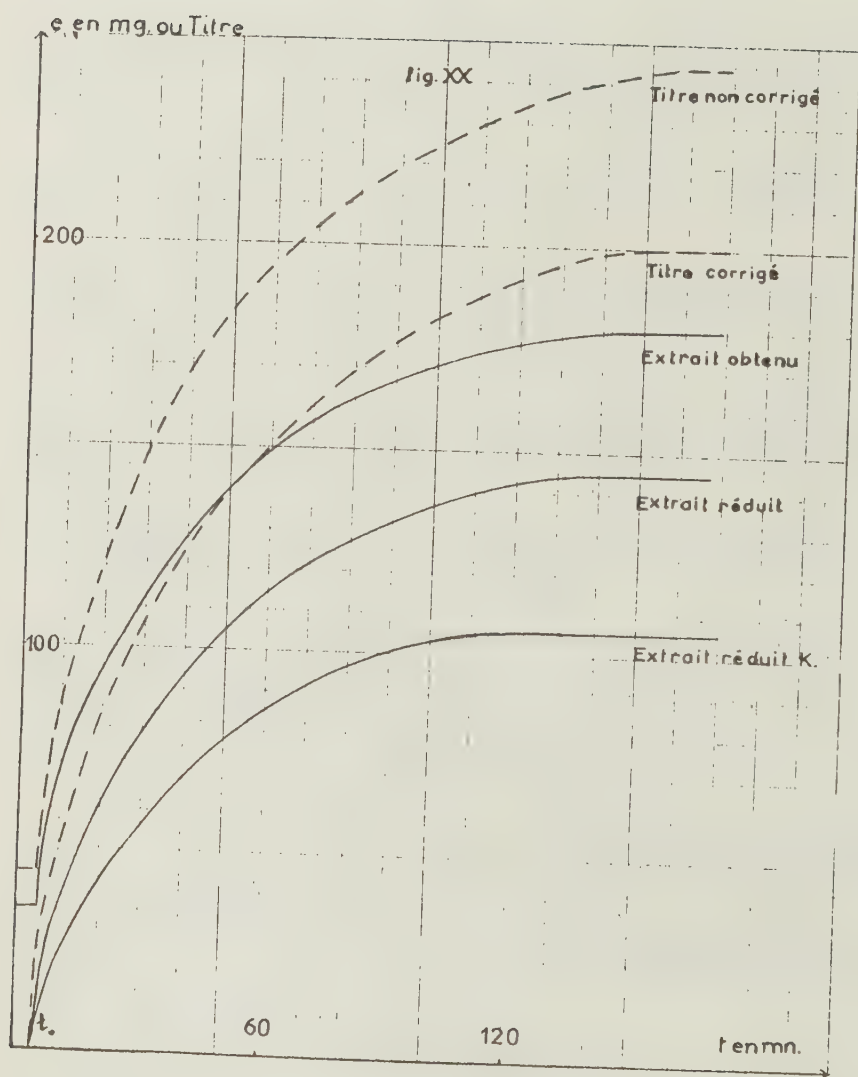
- 15 mg. de papaïne ont donc hydrolysé 0,880 g. de fibrine sèche, soit en fibrine fraîche :

$$0,880 \times 4 = 3,520 \text{ g.}$$

- 1 mg. de papaïne a donc protéolysé :

$$\frac{3,520}{15} = 0,2346 \text{ g. de fibrine, soit } 234,6 \text{ mg.}$$

Le titre de la papaïne étudiée ici est donc 243,6 .



Mais nous avons vu que les 0,176 g. d'extrait sec se composaient, en fait, de l'extrait sec propre à la fibrine, augmenté des produits d'hydrolyse dus à l'action de la papaine .

Soit :  $0,1760 = 0,0335 + x$

$x$  étant les produits d'hydrolyse ,

$$x = 0,1760 - 0,0335 = 0,1425 \text{ g.}$$

- 15 mg. de papaine n'ont donc hydrolysé que :

$$0,1425 \times 5 \times 4 = 2,850 \text{ g. de fibrine fraîche,}$$

soit : 2.850 mg .

- 1 mg. de papaine a hydrolysé :

$$\frac{2.850}{15} = 190$$

- le titre corrigé de la papaine étudiée ici est donc : 190 .

- A chaque hydrolyse effectuée en un temps donné, nous ferons correspondre à chaque extrait sec un titre calculé selon ces principes.

- Nous tracerons donc, sur un même graphique, ( fig. XX ) :

$\left\{ \begin{array}{l} \text{les courbes d'extrait sec réel obtenu} \\ \text{« « « réduit} \\ \text{« de titre non corrigé} \\ \text{« « corrigé} \end{array} \right.$

ceci, en portant le temps  $t$  en abscisses, le poids  $p$  d'extrait sec ou le titre  $T$  en ordonnées .

#### B) Etude de ces courbes : fig XX :

1) Courbe des extraits secs réduits : Elle montre un palier très net qui s'établit après deux heures, l'accroissement entre deux heures et trois heures étant très faible .

2) Courbe des titres corrigés : Elle nous indique qu'avant deux heures, on a un titre dont la valeur est fonction du temps sans que ce soit selon une fonction linéaire . Au-delà de deux heures, la courbe montre un palier, le titre devient indépendant du temps d'hydrolyse.

Avant deux heures, le titre dépendant du temps d'une façon non linéaire, sa définition demanderait donc que l'on choisisse, à ce stade de l'hydrolyse, une durée arbitraire d'expérience . Le titre ainsi obtenu serait absolument empirique .

On pourrait espérer avoir une meilleure définition en considérant un titre de papaine comme étant le résultat de l'hydrolyse par unité de temps . Il n'en est rien, car une telle proposition pourrait entraîner

ner des erreurs graves, ( fonction non linéaire) . On pourrait croire, par exemple, qu'une papaine de titre  $T_1$  par minute, hydrolyse 10 fois plus en 10 minutes qu'en 1 minute. Nos résultats d'expérience montrent qu'il n'en est rien puisque l' n'est pas fonction linéaire du temps.

Il est donc nécessaire de définir le titre d'une papaine comme le résultat de l'hydrolyse de 2,500 g. de fibrine pendant au moins deux heures .

C) Traduction de ces résultats en coordonnées semi-logarithmiques .

Si nous traduisons nos résultats expérimentaux en coordonnées semi-logarithmiques, soit le temps en logarithme et le poids d'extrait sec en échelle arithmétique, nous obtenons, au delà d'un certain temps d'induction  $t_0$ , des droites jusqu'à 120 minutes, puis des paliers horizontaux au-delà. ( fig. XXI) .

Une telle représentation indique que la cinétique de cette réaction suit une loi exponentielle : par exemple, on a, en deçà de 120 minutes, pour les variations de l'extrait réduit, l'équation :

$$\begin{aligned} e &= a \log. t + b \\ \text{ou en posant} \quad b &= -a \log. t_0 \\ e &= a \log. t - a \log. t_0 \\ \text{soit :} \quad e &= a ( \log. t - \log. t_0 ) \\ e &= a \log. \frac{t}{t_0} \end{aligned}$$

Ce temps  $t_0$  (  $\neq$  5 mn. ) correspond à la période initiale de l'expérience pendant laquelle rien ne semble se produire . Ceci peut être dû à plusieurs faits :

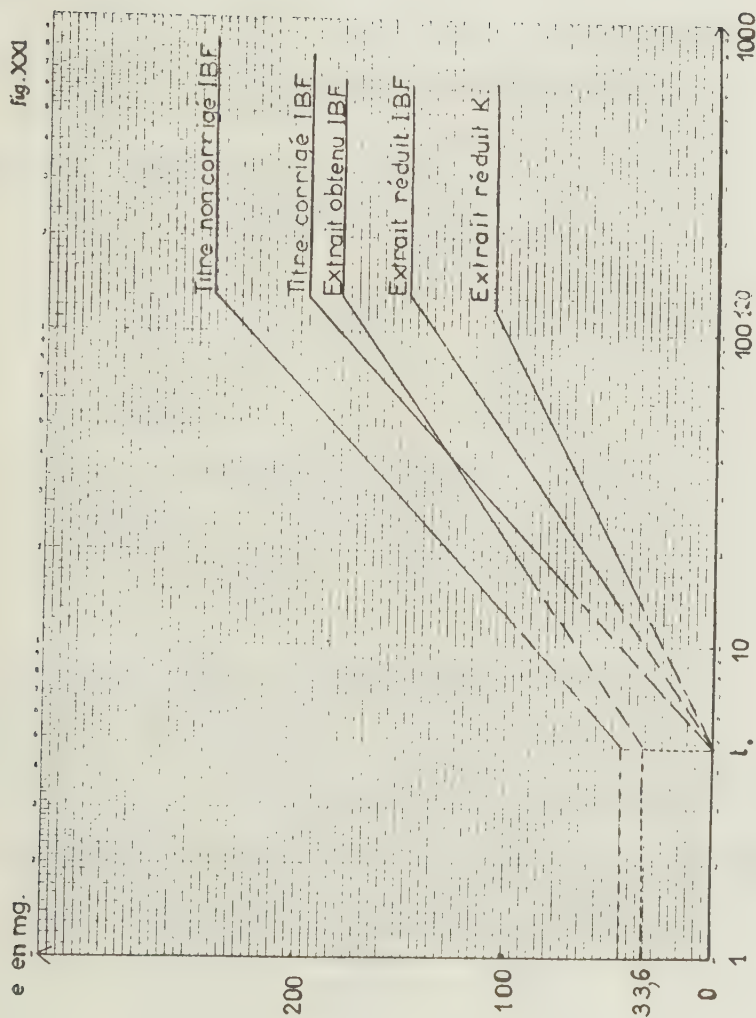
- à la mise en température du matras et de son contenu, l'hydrolyse n'avançant que de façon non mesurable, nous l'avons vu, à basse température. Nous avons mesuré ce temps de mise en température qui est de 5 mn. environ ( cf. page 66 ), à l'aide de notre dispositif de couple thermoélectrique ; ( fig. XV ) .

- à une véritable période d'induction de la réaction ;
- à une solubilisation partielle des substances ;
- plus vraisemblablement à l'ensemble de ces phénomènes .

Etudions plus en détail la courbe d'extrait sec réel obtenu : ( fig. XXI ) ( en ordonnées les extraits secs en milligrammes, en abscisses les logarithmes des temps ) .

Cette courbe comporte trois régions :

fig. XXI



t en mn.

Echelle logarithmique

- de l'instant initial à l'instant  $t_0$ , une parallèle à l'axe des abscisses ( correspondant à un extrait sec constant de 33,5 mg.: partie soluble de la fibrine dans les conditions de l'expérience ) ;

- une droite qui peut se déduire de celle de l'extrait sec réduit correspondant par simple translation ;

- un second palier horizontal au delà de 120 mn. qui correspond à l'arrêt de la réaction .

D) Des expériences semblables, menées avec des échantillons moins purs de papaïne que celle de l'I.B.F. montrent :

- que le temps de deux heures est toujours suffisant, la réaction étant pratiquement terminée à ce moment ;

- que la même loi cinétique reste valable .

Exemple : Papaïne K .

|                      |   |                |           |
|----------------------|---|----------------|-----------|
| hydrolyse de 30 mn . | : | extrait sec de | 96,5 mg.  |
| « 60 mn .            | : | « «            | 116,5     |
| « 120 mn .           | : | « «            | 140       |
| « 150 mn .           | : | « »            | 139,5 mg. |

La courbe d'extrait sec réduit de la papaïne K . se situe au-dessous de celle correspondant à la papaïne I.B.F. ( fig. XX ) . Ft , en coordonnées semi-logarithmiques, les droites représentant les extraits secs réduits des papaïnes I.B.F. et K. sont concourantes au point  $t_0$  . ( fig. XXI ) .

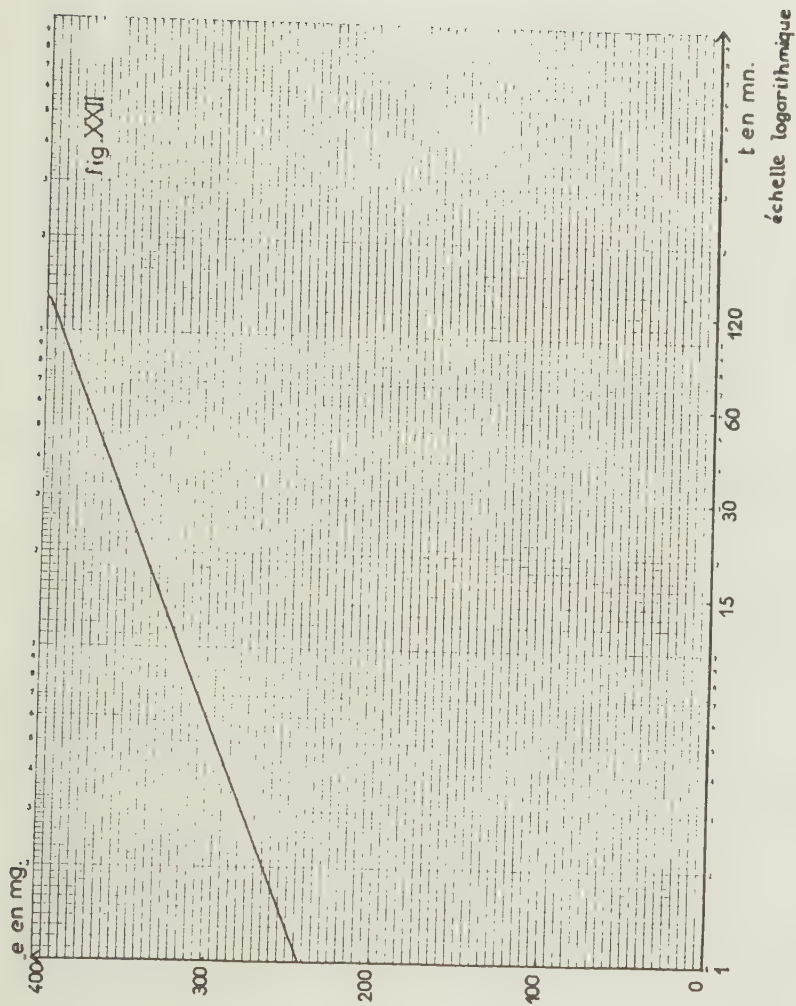
E) Des expériences semblables, effectuées avec une concentration relative dix fois plus

forte de papaïne par rapport à la fibrine que dans le cas précédent, donnent encore une loi cinétique de la même forme ( en coordonnées semi-logarithmiques , page 10 fig. XXII ) .

Expérience : Papaïne I.B.F. : 150 mg., agissant sur 2,50 g. de fibrine, donnent les résultats suivants :

|                     |              |             |
|---------------------|--------------|-------------|
| hydrolyse de 15 mn. | extrait réel | : 367,6 mg. |
| «                   | « réduit     | : 334,1 mg. |
| « 30 mn.            | extrait réel | : 386,1 mg. |
| «                   | « réduit     | : 352,6 mg. |
| « 60 mn.            | extrait réel | : 410,7 mg. |
| «                   | « réduit     | : 377,2 mg. |
| « 120 mn.           | extrait réel | : 428,5 mg. |
| «                   | « réduit     | : 395 mg.   |

Il est à remarquer toutefois que, dans cette expérience, le temps  $t_0$  devient très faible puisqu'il est égal à :



$$t_0 = 4 \times 10^{-5} \text{ mn.}$$

La pente a, par contre, légèrement augmenté : c'est ainsi que l'expérience effectuée avec 150 mg. de papaine I.B.F. peut se traduire par :

$$\log. \left( \frac{t}{4 \times 10^{-5}} \right)^{\text{mn.}} \doteq 0,0166 \times e \text{ (mg.)}$$

tandis que l'expérience avec 15 mg. peut s'écrire :

$$\log. \left( \frac{t}{4,8} \right)^{\text{mn.}} = 0,010 \times e \text{ (mg.)}$$

1) Nous remarquons que 15 mg. de papaine n'hydrolysent en deux heures qu'une petite quantité de la fibrine mise en jeu. L'extrait sec de 10 ml. de filtrat est au maximum de 180 mg. pour notre meilleure papaine, soit au total, de 900 mg. pour 50 ml. de filtrat.

15 mg. de papaine n'hydrolysent que 900 mg. de fibrine sur 2.500 mg.

Pourquoi cette hydrolyse n'est-elle pas totale ? La papaine est-elle inactivée par ses produits d'hydrolyse ou s'agit-il d'une spécificité de l'enzyme qui ne s'attaquerait qu'à certaines liaisons de la fibrine ?

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons mené l'expérience suivante :

Nous avons fait l'hydrolyse de 2,500g de fibrine en deux heures dans trois flacons : ( 1 - 2 - 3 ) ;

- le flacon 1 est conservé comme témoin ;

- nous ajoutons dans le flacon 2 : 2,500 g. de fibrine ; ( la papaine, en tant qu'enzyme, ne doit pas être détruite par la première hydrolyse, et, si elle n'est pas inactivée par les produits d'hydrolyse, elle attaquera ces 2,500 g. de fibrine ajoutés ) .

Cette nouvelle hydrolyse est menée pendant 15 mn.

- nous ajoutons également 2,500 g. de fibrine dans le flacon 3 ;  
puis nous effectuons une hydrolyse de 40 mn ;

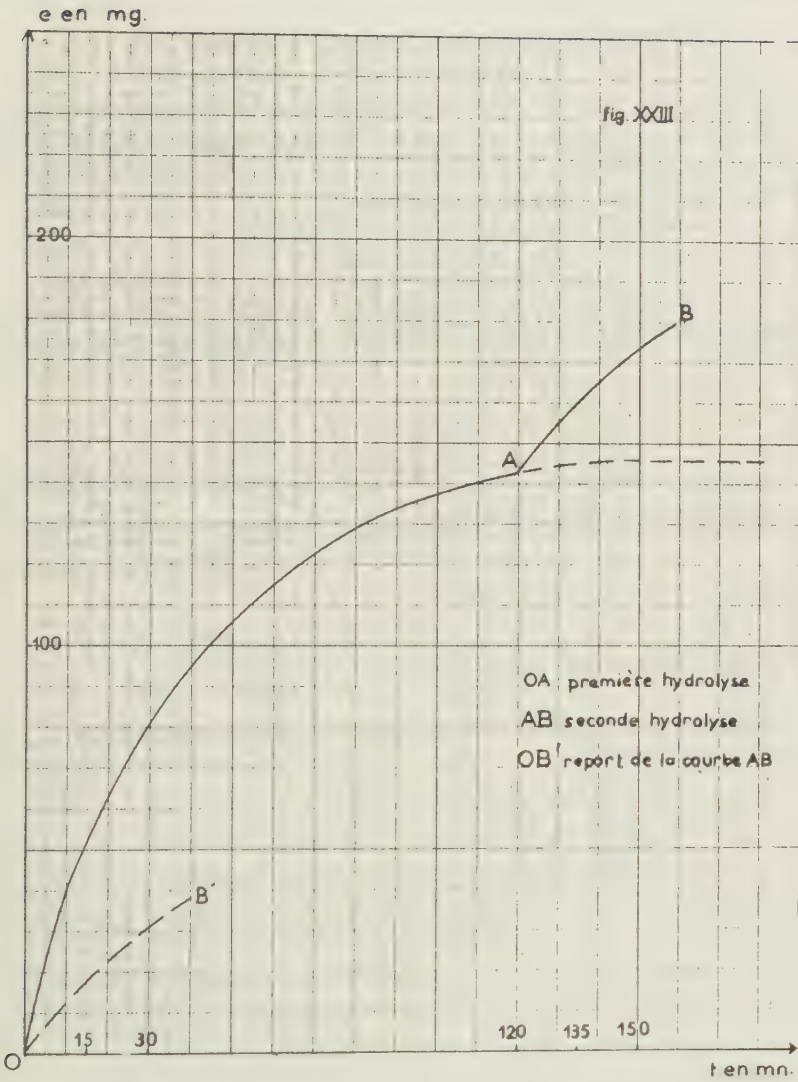
- nous commencerons ainsi à tracer la courbe cinétique de cette seconde hydrolyse ;

- Résultats :

flacon 1 témoin : extrait sec : 167,5 mn.

« 2 exp. : « « : 216,3 mn.

« 3 exp. : « « : 238,4 mn.



Ainsi, une hydrolyse de 15 mn. donne-t-elle, à partir de la nouvelle quantité de fibrine, un extrait sec de 48,8 mg. et une hydrolyse menée pendant 40 mn. un extrait sec de 70,9 mg;

soit, en tenant compte de la partie soluble de la nouvelle quantité de fibrine introduite :

en 15 minutes : extrait sec réduit : 15,3 mg.

en 40 « « « « 37,4 mg.

Si nous reportons sur un graphique ces nouveaux points, ceux-ci sont loin de se replacer sur la courbe correspondant à la première hydrolyse ; ( fig. XXIII ) :

courbe OA : première hydrolyse ;

courbe AB : seconde hydrolyse plus lente ;

courbe OA' : rapport de la courbe AB .

Il nous faut donc conclure que les produits formés au cours de la première hydrolyse inhibent partiellement la papaine dans son action sur la nouvelle quantité de fibrine.

## II - Influence de la variation des concentrations relatives de papaine et de fibrine , le temps d'hydrolyse étant maintenu constant (2h).

Pour une même quantité de fibrine LNCM , soit 2,500 g., nous utiliserons successivement :

15 mg., 30 mg., 45mg., 60 mg., 90 mg., 105 mg., 120 mg., et 150 mg. d'une même papaine .

Nous ferons ces essais successivement et parallèlement sur les papaines suivantes :

- I.B.F. , poudre très pure ;

- I. Pasteur, poudre très pure, conservée en ampoule scellée ;

- suc de papayer de Ceylan, très impur, jaunâtre, pulvérisé à 8.000 tours /minute à l'aide de « l'appareil polyvalent pour l'officine » (cf. page 85) .

- papaine en poudre K. , passée préalablement à 8.000 tours /minute pour l'homogénéiser.

Nous noterons, pour chacune d'elles, les résultats d'une hydrolyse de deux heures.

TABLEAU DES RESULTATS

fig. XXIV

|                     | PAPAINÉ<br>( en mg.) | Extrait sec<br>réduit | Titre |
|---------------------|----------------------|-----------------------|-------|
| I. B. F.            | 15                   | 143,3                 | 291   |
|                     | 60                   | 241,1                 | 80,3  |
|                     | 105                  | 292,8                 | 56,7  |
|                     | 150                  | 323                   | 43    |
| Institut<br>Pasteur | 15                   | 145,5                 |       |
|                     | 30                   | 182,1                 |       |
|                     | 45                   | 218,7                 |       |
|                     | 60                   | 241,0                 |       |
|                     | 90                   | 275,2                 |       |
|                     | 120                  | 298,1                 |       |
|                     | 150                  | 315,1                 |       |
| Ceylan              | 15                   | 128,1                 |       |
|                     | 60                   | 225,4                 |       |
|                     | 105                  | 256,4                 |       |
|                     | 150                  | 292,3                 |       |
| K.                  | 15                   | 116,5                 |       |
|                     | 60                   | 229,5                 |       |
|                     | 105                  | 241,3                 |       |
|                     | 150                  | 275,3                 |       |

Nous traduirons nos résultats :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{sur papier millimétré normal} \\ \text{sur papier semi-logarithmique} \\ \text{sur papier logarithmique .} \end{array} \right.$$

1) Sur papier millimétré normal : ceci de façon à avoir une représentation plus habituelle du phénomène . ( cf. fig. XXV , page 107) .

Nous obtenons des courbes qui semblent pouvoir être déduites les unes des autres par simple changement de l' échelle des ordonnées .

Nous pouvons d'ailleurs vérifier graphiquement l'homothétie des ordonnées de ces courbes : en comparant les papaines K. , I.B.F. et I. Pasteur, on peut vérifier que l'on a, quelle que soit la concentration en papaine , ( entre 15 mg. et 150 mg) :

$$\frac{y_K}{y_{IBF}} = C_{ste}$$

$$\frac{y_P}{y_{IBF}} = C_{ste}$$

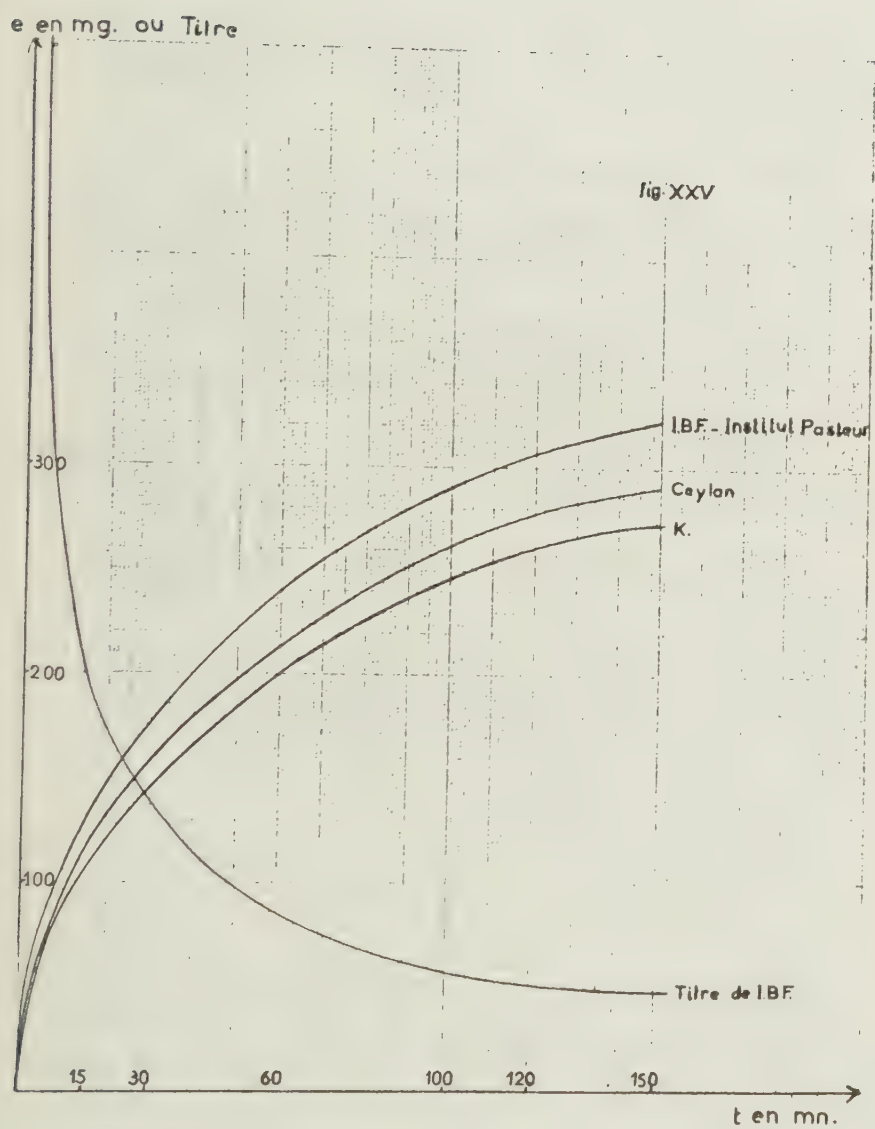
$$\frac{y_K}{y_P} = C_{ste}$$

Cette constance est prouvée par les résultats ci-dessous, aux erreurs d'expérience près .

| c                     | 15    | 30    | 45    | 60    | 90    | 120   | 150   |                                |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| $\frac{y_K}{y_{IBF}}$ | 0,849 | 0,853 | 0,862 | 0,813 | 0,860 | 0,820 | 0,820 | valeur<br>moyenne :<br>0,839   |
|                       |       |       |       |       |       |       |       | écarts maxima :<br>3,1% - 2,7% |
| $\frac{y_K}{y_P}$     | 0,978 | 0,912 | 0,862 | 0,840 | 0,880 | 0,840 | 0,890 |                                |

Comme nous avons porté en ordonnées les extraits secs réduits, les courbes obtenues passent toutes par l'origine .

De plus, nous tenons à signaler que Madame J. DELMOTTE - PLAQUEFF a indiqué que l'extrait sec était une fonction linéaire de la



concentration en papaine; mais, suivant la zone de concentration où elle travaille, elle obtient deux droites différentes.

Après notre étude, il semble bien évident que ces droites sont en réalité les cordes qui soutiennent les arcs correspondants de nos courbes pour l'intervalle de concentration enzymatique envisagé. Confondre les deux n'est admissible que si l'on travaille dans un intervalle de concentration assez étroit, en particulier dans les régions de grande courbure.

2) Sur papier semi-logarithmique : Nous avons voulu étudier une telle représentation, utilisée auparavant par HOOVER et HOKES d'une part, LAGER d'autre part. Les premiers ont travaillé sur la caséine et sur les substrats synthétiques; ils concluent :

*« la digestion par la papaine est fonction linéaire du logarithme de la concentration en papaine »*. (43)

Le second utilise de l'albumine d'oeuf frais comme substrat; il écrit :

*« pour déterminer la valeur d'une papaine inconnue, faire une courbe avec les volumes digérés par 0,1 mg., 0,2 mg., 0,3 mg. de papaine de référence par rapport au logarithme de la concentration en papaine »*. (53).

Nous utiliserons l'échelle arithmétique pour les extraits secs, l'échelle logarithmique pour les concentrations en papaine. (fig. XXVI page 109).

Dans cette représentation, nous devrions, d'après HOOVER, HOKES et LAGER, obtenir une droite, c'est-à-dire que les phénomènes pourraient être représentés par une équation de la forme :

$$\log. c = ap + b$$

c : concentration en papaine,

p : poids d'extrait sec

a : constante

b : constante

avec  $a > 0$

en particulier, pour  $c = 1$ , soit  $\log. c = 0$ , on devrait avoir :

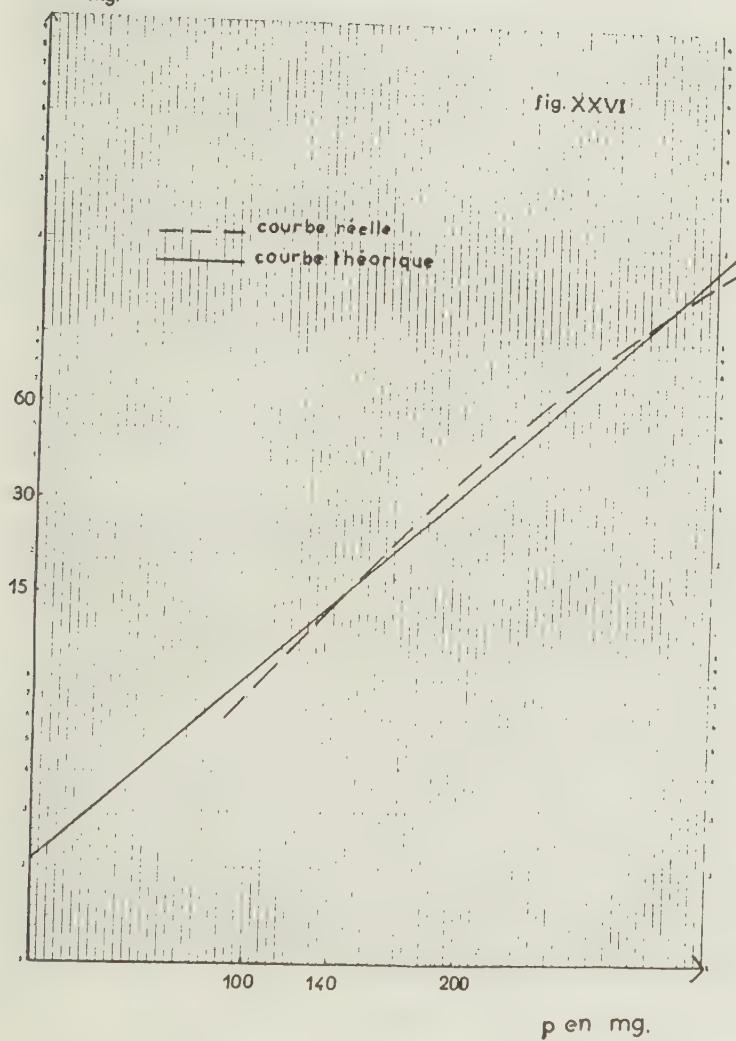
$$0 = ap_1 + b$$

ce qui entraînerait b négatif; or, si, en tenant compte des erreurs possibles, on peut, à la rigueur, faire passer une droite par les points représentatifs des résultats obtenus, (avec I.R.F. ou I. Pasteur) on voit sur la figure que cette droite aurait obligatoirement une ordonnée à l'origine positive, c'est-à-dire  $b > 0$ .

Une telle représentation des résultats obtenus dans nos conditions expérimentales est donc impossible.

échelle logarithmique

C en mg.



D'ailleurs, il est plus vraisemblable que nos différents points se placent sur une courbe telle que celle tracée en pointillé sur notre figure . ( fig. XXVI ).

Nous tenons à signaler qu'en intervertissant c et p ( échelle arithmétique pour c et échelle logarithmique pour p ), nous n'obtenons pas non plus une représentation linéaire .

3) Sur papier logarithmique : Par contre, si nous essayons de reporter nos résultats sur papier logarithmique, nous obtenons sans difficulté des points en ligne droite pour une même papaine . ( fig. XXVII ) .

Pour diverses papaines, nous obtenons des droites sensiblement parallèles .

Ce phénomène chimique pourrait donc se représenter par une équation de la forme :

$$\log. ( p - f ) = a \log. c + b$$

p : extrait sec de 10 ml. de filtrat

f : produits solubles issus de la fibrine et contenus dans 10 ml. de filtrat d'hydrolyse ,

c : concentration en papaine ,

a et b étant des constantes que nous préciserons par la suite .

Convenons , dès maintenant, que, lorsque nous parlerons d'extrait sec, il s'agira de l'extrait sec réduit que nous avons précédemment défini. Nous appellerons p cet extrait, désormais . La formule précédente devient donc :

$$\log. p = a \log. c + b$$

pour des raisons d'homogénéité évidentes, nous poserons :

$$b = \log. p_0$$

$p_0$  : extrait sec à l'origine .

d'où :

$$\log. p = a \log. c + \log. p_0$$

①

1) équation des droites :

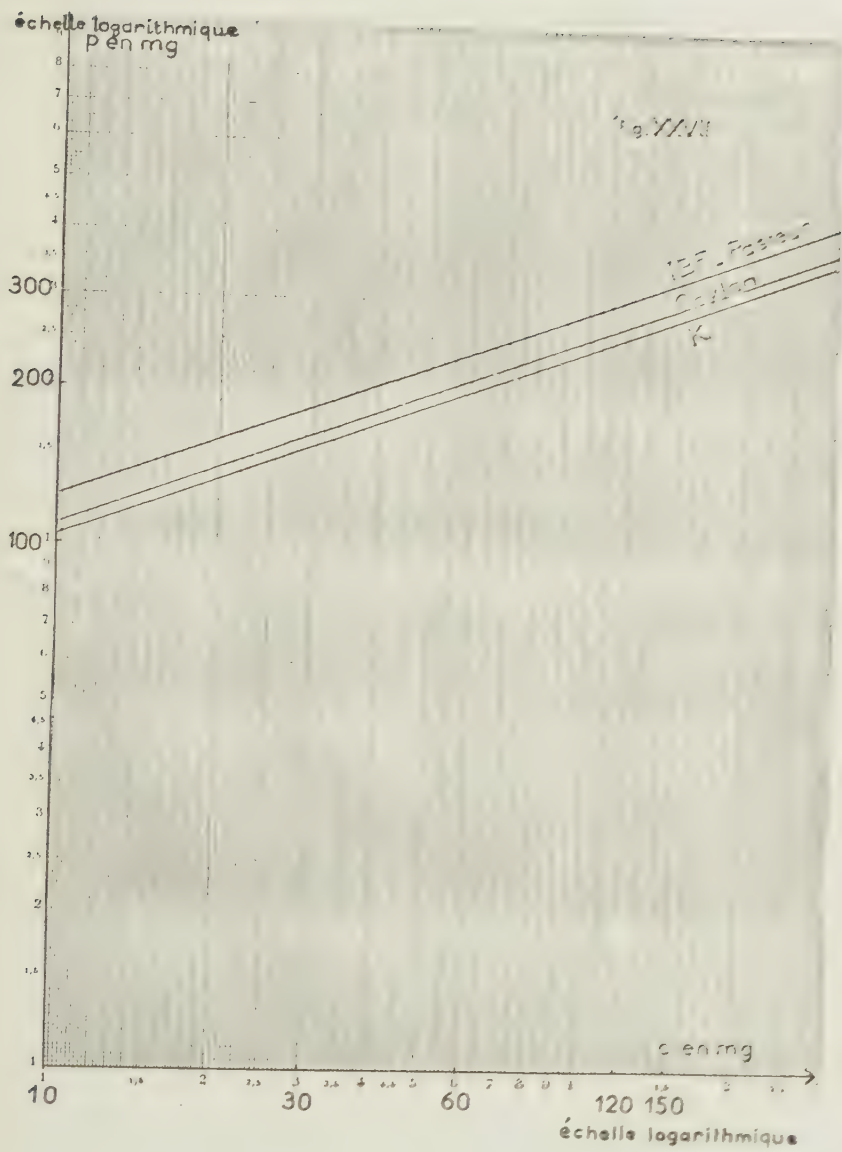
de l'équation (1) nous tirons :

$$\log. p - \log. p_0 = a \log. c$$

$$\log. \frac{p}{p_0} = \log. c^a$$

d'où :

$$\frac{p}{p_0} = c^a \quad a \neq 1/3$$



$$p = p_o c^a$$

2

## 2) équation des courbes

On voit que pour  $c = 1$ , on a  $p = p_o$ .

$$\frac{\div}{\div} \frac{\div}{\div}$$

ETUDE DE LA REACTION SUBSTRAT - PAPAINÉ

B) FIBRINE EN PRESENCE D'UN ACTIVATEUR

## ETUDE DE LA REACTION SUBSTRAT - PAPAINE

### B) FIBRINE + ACTIVATEUR

Nous avons vu le rôle joué par les activateurs de la papaine. (cf. page 35) .

R. GAUTHIER , G. CAPPELAERE et GEOFFROY ont préconisé l'addition de 0,50 g. de chlorhydrate de cystéine dans le dosage du Codex français, que nous venons d'étudier . (34) . Nous avons voulu vérifier l'intérêt d'une telle modification des conditions opératoires dans ce dosage , qui repose essentiellement sur la pesée d'une partie aliquote du filtrat de l'hydrolysate.

Pour que cette addition soit rationnelle, il faut qu'elle ne change pas la reproductibilité des résultats . Or, en tant que composé thiol, la cystéine attaque les acides aminés et les peptides. Effectivement, en laissant de la cystéine au contact de fibrine, en présence d'eau, on observe, au bout d'un certain temps, une gélification, en l'absence de papaine.

Nous avons déterminé successivement les extraits secs de 10 ml. de filtrat des mélanges suivants portés à 70° pendant deux heures :

- 1 :  $\left\{ \begin{array}{l} 0,015 \text{ g. de papaine IBF ,} \\ 0,050 \text{ g. de chlorhydrate de cystéine,} \\ 50 \text{ ml. d'eau épurée.} \end{array} \right.$
- 2 :  $\left\{ \begin{array}{l} 0,150 \text{ g. de papaine IBF ,} \\ 0,500 \text{ g. de chlorhydrate de cystéine,} \\ 50 \text{ ml. d'eau épurée .} \end{array} \right.$
- 3 :  $\left\{ \begin{array}{l} 2,500 \text{ g. de fibrine LNCM ,} \\ 0,050 \text{ g. de chlorhydrate de cystéine ,} \\ 50 \text{ ml. d'eau épurée .} \end{array} \right.$
- 4 :  $\left\{ \begin{array}{l} 2,500 \text{ g. de fibrine LNCM ,} \\ 0,500 \text{ g. de chlorhydrate de cystéine,} \\ 50 \text{ ml. d'eau épurée .} \end{array} \right.$

Résultats : La solution obtenue par filtration de l'hydrolysate I contient donc, d'une part, du chlorhydrate de cystéine, qui est soluble, d'autre part, de la papaine peu soluble. Elle donne comme extrait sec : 12,5 mg. pour 10 ml. de filtrat . La présence du chlorhydrate de cystéine donnerait comme extrait

sec : 10 mg. .

- La solution 2 a un extrait sec de 117,1 mg. au lieu des 100mg. dus au seul chlorhydrate de cystéine.

- Il y a donc augmentation de l'extrait sec par suite de l'action solubilisante de la cystéine sur la papaïne .

- La solution 3 comprend 2,500g. de fibrine LNCM ; celle-ci possède un extrait sec propre de 33,5 mg. en l'absence de cystéine ( dans les conditions de l'expérience ) . Ici la solution 3 donne un extrait sec de 172 mg. pour 10 ml. de filtrat au lieu des :  $33,5 + 10$  soit 43,5mg. attendus s'il n'y avait pas d'interaction.

- L'expérience 4 donne un gel absolument infiltrable qui traduit une forte action de la cystéine sur la fibrine .

Dans ces conditions, la détermination de l'action de la papaïne activée sur la fibrine par pesée de l'extrait sec d'une partie aliquote du filtrat paraît, a priori, difficile . Il semble, en effet, délicat de dire quelles sont, dans cet extrait, les parties qui correspondent à la solubilisation de la papaïne ou de la fibrine sous l'action de la cystéine seule, et quelles sont celles qui sont dues à l'action hydrolysante pure de la papaïne plus ou moins activée.

Néanmoins, nous avons voulu appliquer cette méthode à l'étude cinétique et d'action de masse de cette réaction papaïne-activateur-fibrine comme nous l'avons fait pour la réaction papaïne-fibrine. Les résultats que nous rapportons ci-dessous sont beaucoup moins précis qu'en l'absence de cystéine; les valeurs obtenues sont ( toutes choses égales ) beaucoup plus dispersées, vraisemblablement par suite de l'action solubilisante propre à la cystéine qui n'est sans doute pas exactement reproductible d'une fois à l'autre .

#### I - ETUDE CINÉTIQUE :

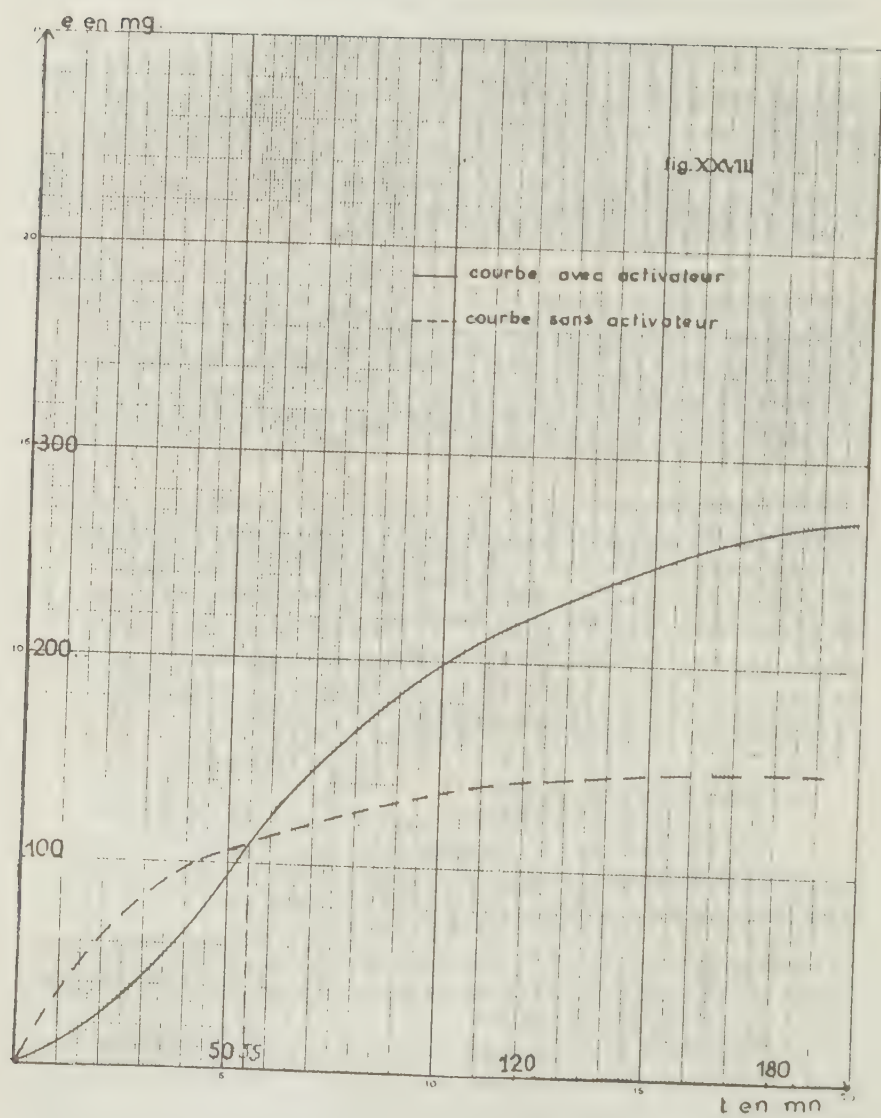
Nous avons admis, d'une façon générale, un extrait sec propre de la fibrine de 33,5 mg. De toutes façons, ceci n'amène qu'un simple décalage par rapport aux ordonnées et la courbe conservera sa forme qui est, en gros, celle d'un S ( fig. XXVIII ) .

Nous avons là un phénomène tout à fait nouveau et qui ne semble pas du tout suivre la même loi cinétique que l'hydrolyse sans activateur .

Au début, le phénomène est ralenti comme s'il y avait compétition entre deux réactifs vis-à-vis du troisième ( comme, par exemple, entre cystéine et papaïne par rapport à la fibrine ) .

Tandis qu'à partir de 45 minutes, l'hydrolyse est nettement accélérée ( pente plus grande ) et plus profonde ( extrait sec plus élevé ) .

A priori, aucune loi simple n'apparaît .



## II - ETUDE d'ACTION de MASSE :

Les faits précédents nous ont été confirmés par l'étude de l'action de masse pour laquelle la présence d'activateur semble perturber la reproductibilité des résultats .

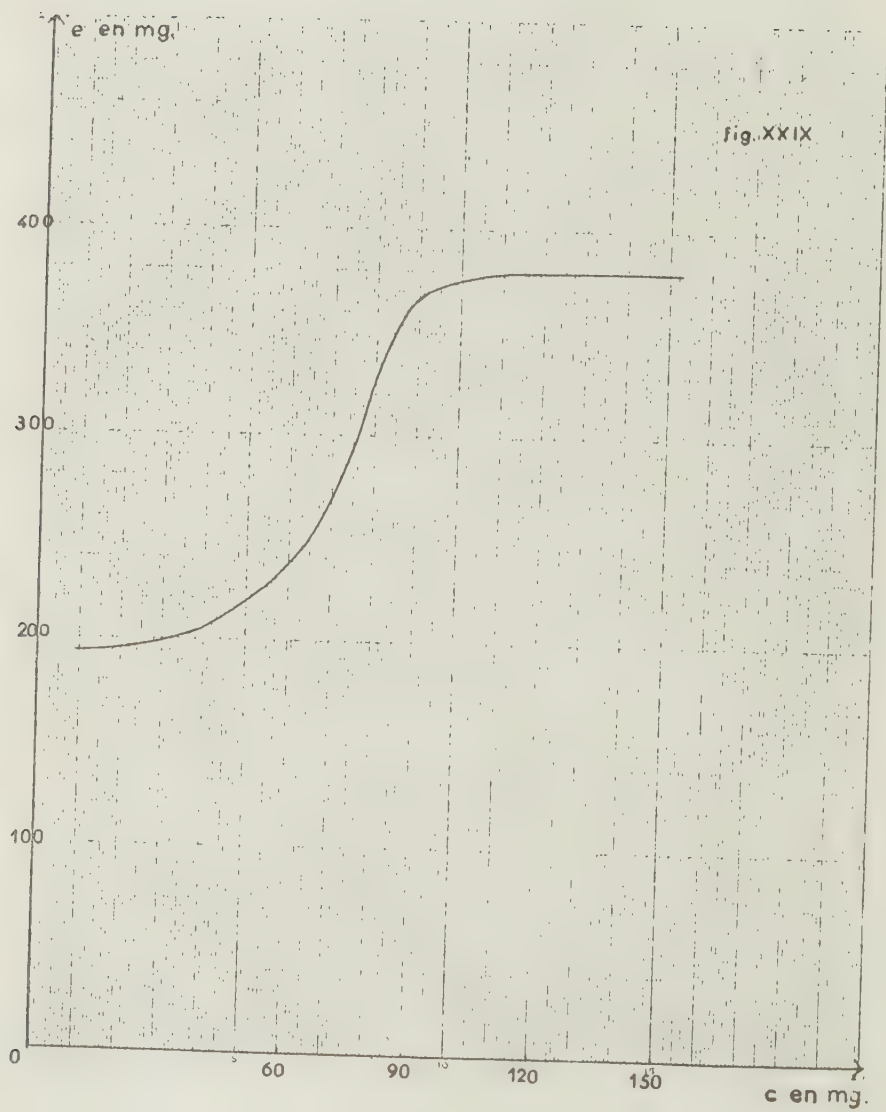
Si nous comparons les courbes obtenues avec et sans activateur (comme nous l'avons indiqué pour l'étude cinétique) , nous observons un palier beaucoup plus rapidement que sans activateur et celui-ci est plus net. Enfin, la concavité de la courbe est tournée en sens inverse ( fig. XXIX ) .

## III- CONCLUSION :

La présence d'activateur ne semble donc pas souhaitable pour déterminer l'activité d'une papaine tout au moins si l'on conserve le principe de la méthode classique .

Par contre, si l'on s'inspire de la méthode du British Pharmaceutical Codex, on ne se heurte pas aux mêmes inconvénients . C'est ce que nous allons étudier maintenant .

$$\begin{array}{c} \div \\ \div \quad \div \\ \div \end{array}$$



ETUDE DE LA REACTION SUBSTRAT - PAPAIN

C) CASEINE

## ETUDE DE LA REACTION SUBSTRAT - PAPAINE

C) CASEINELoi cinétique et loi d'action de masse.

Parallèlement à cette étude de la fibrine, nous avons voulu envisager l'action de la papaine sur un second substrat : la caséine.

De nombreux travaux ont été menés par différents auteurs sur ce sujet. Nous avons cité ceux de BULLOCK et SEN (17), qui ont comparé les dosages de la papaine inscrits aux British Pharmaceutical Codex de 1934 et 1949. (16). Quels que soient les détails de mode opératoire préconisés, le test final de la réaction est une formoltitration des acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse. Celle-ci est partielle comme dans le dosage par la fibrine, que nous venons d'étudier.

Nous avons vu les avantages et les inconvénients de la formoltitration page 47. Il est certain que si l'on opère dans des conditions de pH bien déterminées, on observera certaines lois; elles ne seront sans doute plus valables si l'on change les conditions d'acidité du dosage.

Il convient donc de travailler à un pH bien déterminé; par exemple, en amenant tous les réactifs utilisés et l'hydrolysate au même pH, contrôlé par une même coloration de l'indicateur choisi.

BULLOCK et SEN ont justifié par leurs travaux l'utilisation de la phénolphtaléine dans ce dosage (17). Nous adopterons donc ce réactif coloré et, comme base de notre travail, le principe et les conditions opératoires du British Pharmaceutical Codex (édition 1954 : dosage de la papaine) (16), ceci, en faisant varier au cours de notre étude les facteurs temps et concentration selon la loi étudiée (cinétique ou action de masse).

*Conditions opératoires :*

Peser 4 grammes de caséine, les dissoudre dans 90 ml. d'eau, ajuster à pH 7 en présence de phénolphtaléine; amener à 100 ml. avec de l'eau distillée.

Peser 0,50 g. de chlorhydrate de cystéine, les dissoudre dans 10 ml. d'eau. Ajuster à pH = 7.

Peser 0,50 g. de papaine, les triturer avec la solution de cystéine, amener à 100 ml. avec de l'eau distillée.

Dans deux flacons A et B, mettre 30 ml. d'eau distillée et 15 ml. de solution de caséine. Dans le flacon A, ajouter 5 ml. de la suspension contenant papaine et chlorhydrate de cystéine. Dans le flacon B, mettre 5 ml. de la même suspension mais préalablement bouillie et refroidie (ceci constitue un essai à blanc).

Porter les flacons A et B à 60° pendant 30 minutes; refroidir

rapidement; ajouter 0,75 ml. de solution de phénolphthaléine à 1% et 10 ml. d'une solution de formol préalablement amenée à pH 7.

Titrer les deux hydrolysats jusqu'à obtention de la même coloration rose à l'aide de soude N/10 ». (16)

REMARQUE - La monographie du British Pharmaceutical Codex impose d'amener la solution de caséine à pH 7,0 et il est indiqué d'opérer en présence de phénolphthaléine, ce qui, a priori, semble assez incompréhensible puisque cet indicateur vire entre pH 8,0 et pH 9,9.

Quoi qu'il en soit, nous amènerons les solutions utilisées à une même teinte rose pâle en présence de phénolphthaléine. Pour avoir une teinte témoin, nous avons préparé une solution diluée d'acide acétique que nous avons neutralisée en présence de cet indicateur.

Nous nous servirons des matras d'hydrolyse précédemment décrits et nous les maintiendrons dans notre bain-marie à thermostat à 60°; nous prendrons la précaution d'agiter vigoureusement la suspension de papaine avant tout prélèvement d'échantillon à doser.

Dans l'ensemble, ce dosage est facile, rapide, mais nécessite de nombreuses précautions pour une bonne reproductibilité des résultats, nécessaire pour l'établissement des lois que nous recherchons.

## I - Etude cinétique

Soit à hydrolyser le mélange suivant :

{ 5 ml. de la solution papaine -cystéine à 0,50 % de papaine,  
15 ml. d'une solution de caséine à 4 %.

Nous étudierons successivement les temps d'hydrolyse suivants :

2 mn., 6 mn., 7 mn., 10 mn., 15 mn., 20 mn., 25 mn., 30 mn.,

60 mn., 120 mn..

Nous sommes allée ainsi bien au-delà du temps prévu par le British Pharmaceutical Codex qui est de trente minutes.

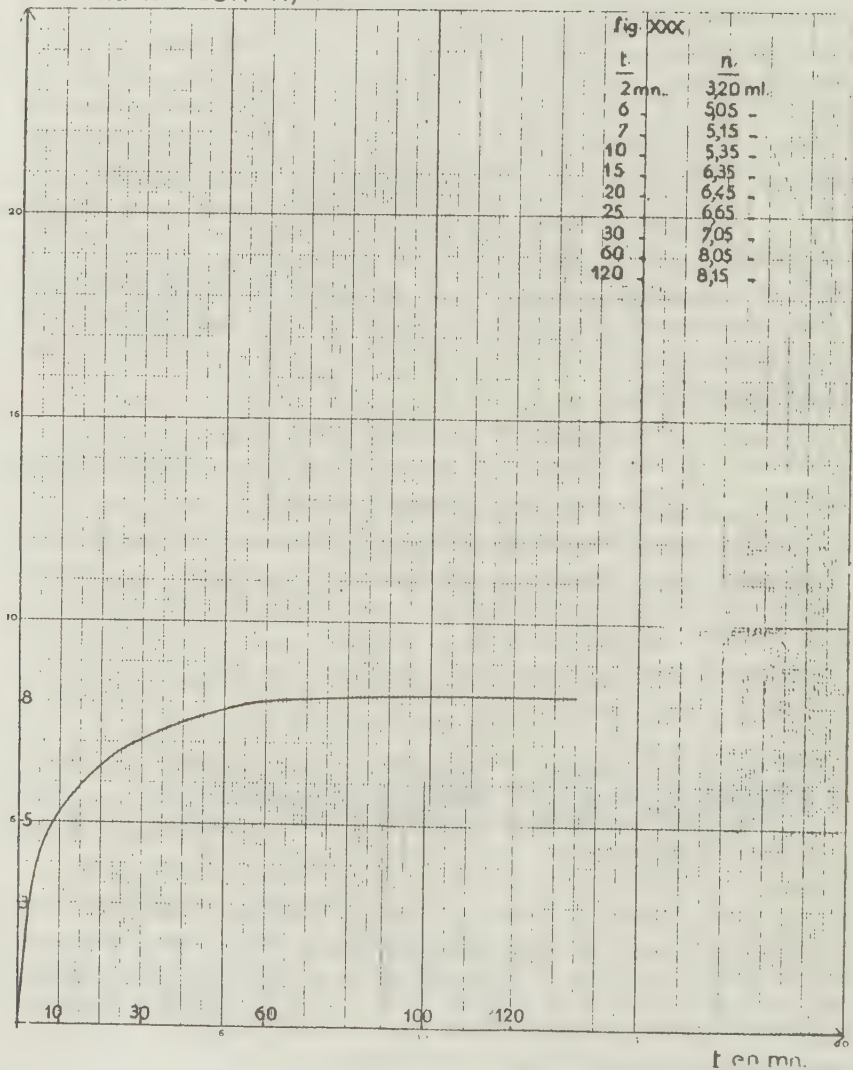
Notre critère d'avancement de l'hydrolyse sera donc le nombre de millilitres de soude N/10 consommés par l'hydrolysate.

Nous rechercherons, comme pour la fibrine, le temps d'hydrolyse minimum à observer.

Courbe obtenue : Nous porterons en abscisses le temps en minutes et en ordonnées la différence entre le nombre de millilitres de soude N/10 utilisés pour amener le liquide d'hydrolyse au rose (teinte de la solution d'acide acétique préparée comme témoin) et le nombre de millilitres de soude N/10 consommés par le témoin pour atteindre ce même virage. (fig. XXX).

Nous constatons que la quantité de soude N/10 consommée augmente très sensiblement entre 30 et 60 mn., soit de 1 ml.. Le palier ne

n en ml. de NaOH N/10.



semble atteint qu'au bout de 60 minutes .

Pour la fibrine, nous avons noté un palier à 120 mn, temps qui correspondait à celui fixé par le Codex français .

Nous voyons ainsi, qu'en appliquant strictement la méthode du « British Pharmaceutical Codex » nous serons obligée de mesurer très rigoureusement le temps d'hydrolyse alors que, dans le cas de la fibrine, le palier observé permet une plus grande marge de sécurité .

Notre courbe a la même allure, aux échelles de coordonnées près, que celle de la fibrine .

Cette analogie est encore plus évidente si nous portons nos résultats sur papier semi-logarithmique .

Courbe sur papier semi-logarithmique : Soit en abscisses le logarithme du temps, en ordonnées et en échelle arithmétique le nombre de millilitres de soude N/10 consommés ( fig. XXXI ).

Les points représentatifs de l'état d'avancement de l'hydrolyse se situent sensiblement sur une droite jusqu'au temps de 60 minutes . Puis, nous observons un palier qui se traduit par une droite horizontale.

Etant donnée cette représentation, nous pensons que la loi cinétique suivie par l'hydrolyse de la caséine par la papaïne est de la forme :

$$n = \alpha \log.t + \beta$$

Posons :  $\beta = - \alpha \log.t_0$ , nous aurons :

$$n = \alpha \log. \frac{t}{t_0}$$

$n$  : nombre de millilitres de soude N/10 consommés

$t$  : temps d'hydrolyse exprimé en minutes .

Nous avons écrit pour l'hydrolyse de la fibrine :

$$e = a \log. \frac{t}{t_0}$$

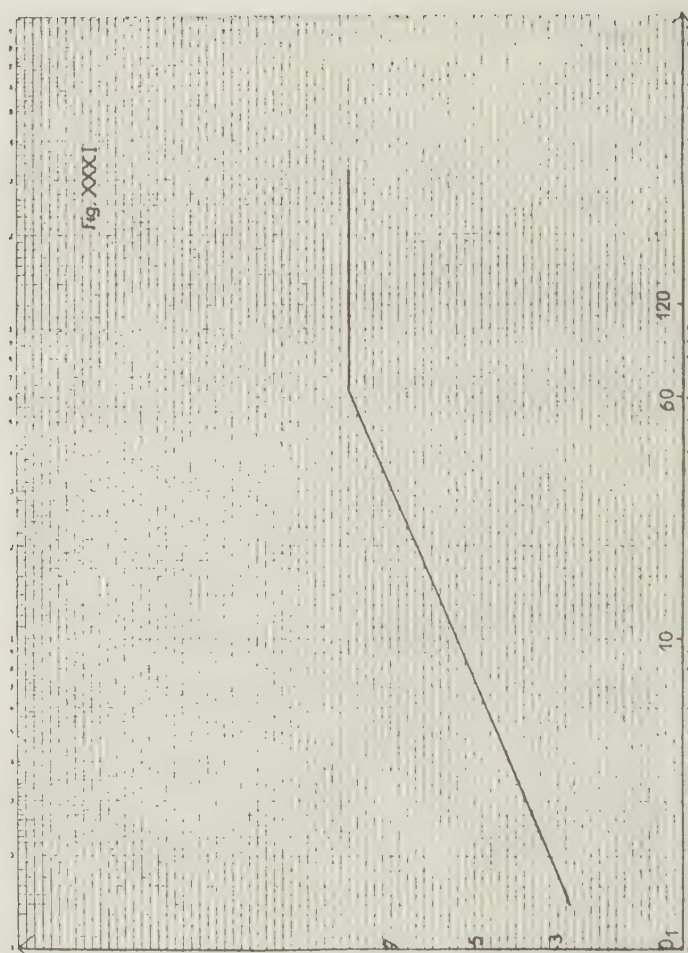
Evidemment ,  $a$  et  $\alpha$  n'ont pas les mêmes valeurs numériques puisque le taux d'hydrolyse est mesuré par des grandeurs différentes;  $n$  est un nombre de millilitres et  $e$  est un poids d'extrait sec exprimé en milligrammes .

## II - Etude d'action de masse :

Nous utiliserons une suspension mère de papaïne à 0,50 g. % . Le temps d'hydrolyse sera mesuré très exactement à 30 minutes .

Nous étudierons successivement l'action sur 15 ml. de solution

n en mL de NaOH N/10



t en mn.

Echelle logarithmique

de caséine de :

2,5 ml. , 5 ml. , 10 ml. , 20 ml. et 30 ml. de cette suspension de papaine rendue homogène par agitation vigoureuse .

Nous obtenons une courbe passant par l'origine . ( fig. XXII ).

Comme pour la fibrine, nous traduirons nos résultats sur papier semi-logarithmique puis logarithmique .

Papier semi-logarithmique : Soit en ordonnées logarithmiques le nombre de millilitres de suspension de papaine et en abscisses arithmétiques, le nombre de millilitres de soude N/10 consommés dans le dosage .

Nous obtenons une courbe qui, de même que dans la représentation de la fibrine, ne semble pas répondre à une équation simple .

Papier logarithmique : Les points représentatifs des résultats de l'hydrolyse se situent sensiblement sur une droite ( fig. XXXIII ) .

Le phénomène peut donc être représenté par la formule :

$$\log. n = a' \log. N + b$$

Posons :  $b = \log. n_0$

d'où :  $\log. \frac{n}{n_0} = \log. Na'$

soit :  $n = n_0 Na'$  avec  $a' \neq 0,84$

Pour la fibrine, nous avons :

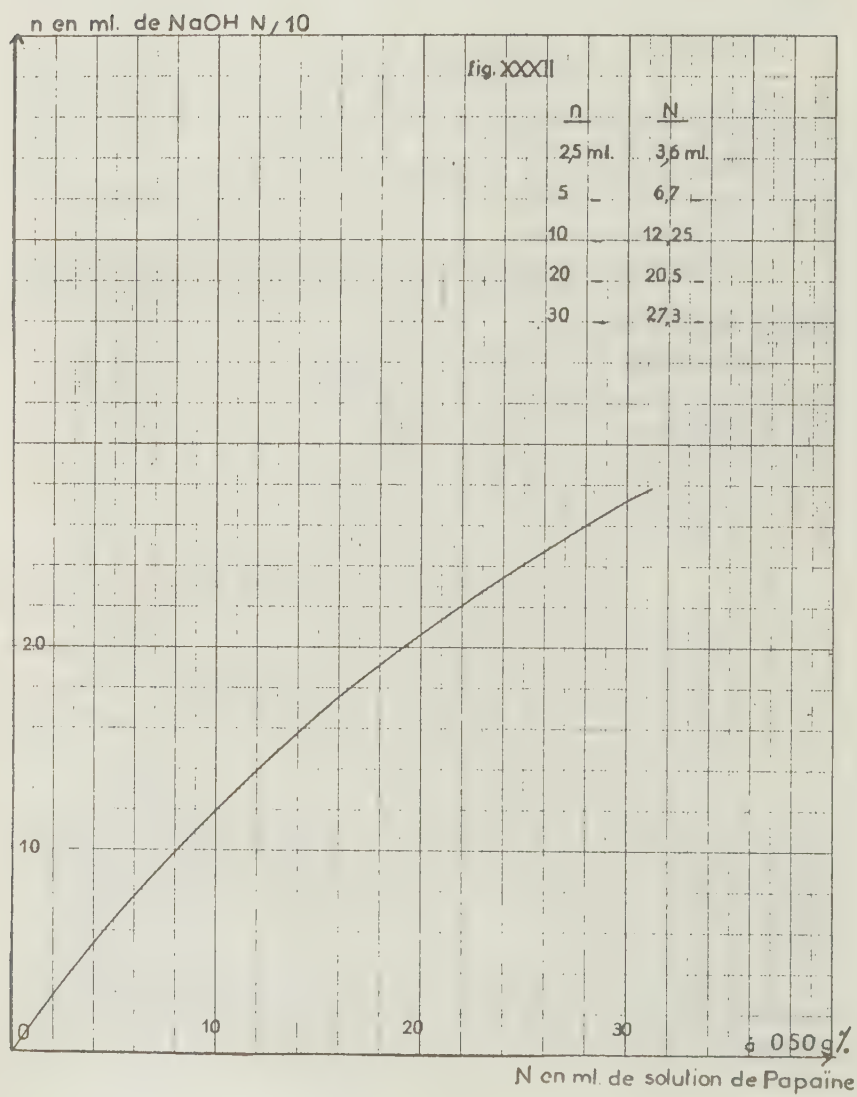
$$p = p_0 c^a \quad \text{avec } a \neq 1/3$$

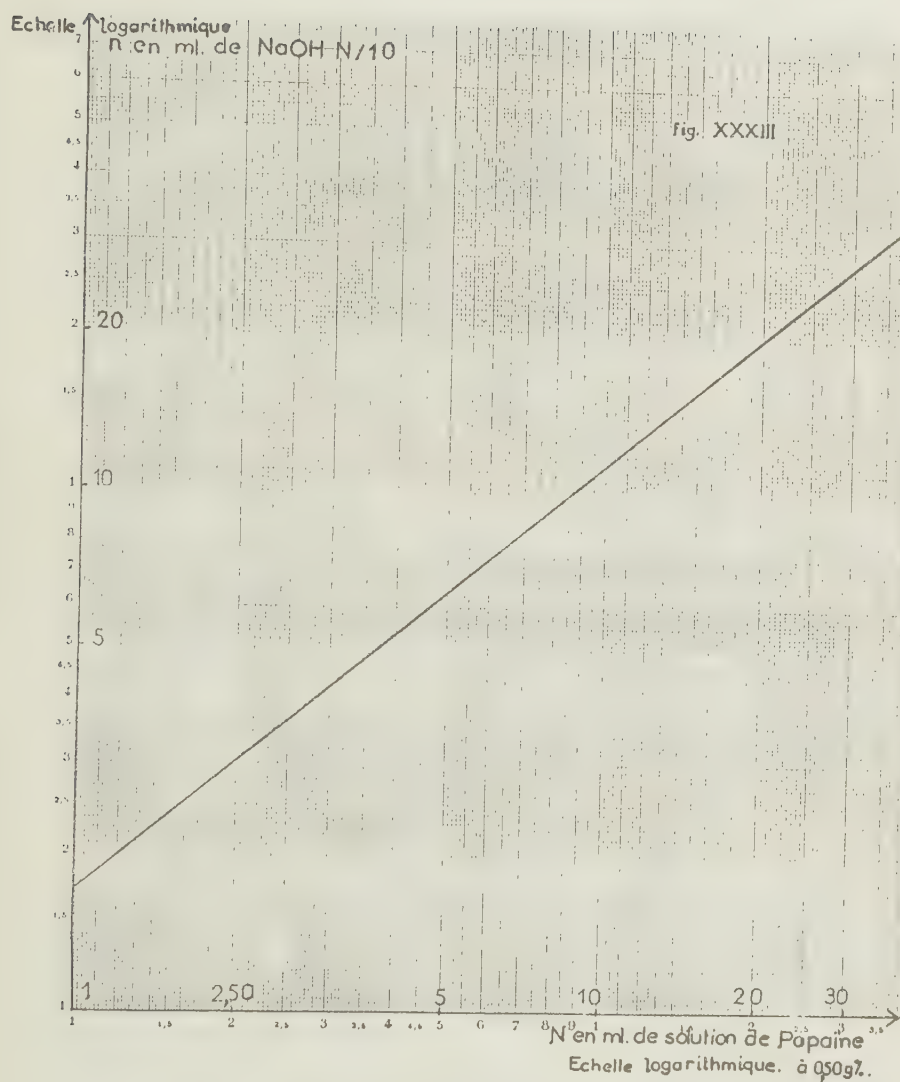
$$p = p_0 c^{1/3}$$

Ici encore,  $a$  est différent de  $a'$  . Il s'agit, en effet, d'un nombre sans dimensions qui dépend de la façon dont on exprime l'avancement de l'hydrolyse, la concentration en papaine, et aussi des conditions d'hydrolyse . Enfin, nous travaillons sur un substrat différent (caséine).

D'une façon générale, ces deux séries de courbes montrent que l'hydrolyse de la caséine suit des lois semblables à celles observées pour la fibrine .

$$\begin{array}{c} \div \\ \div \quad \div \\ \div \end{array}$$





## Chapitre V

DEFINITION D'UN TITRE  
METHODE DE DOSAGE PROPOSEE

## DEFINITION D'UN TITRE

### METHODE DE DOSAGE PROPOSEE

---

Nous avons montré que l'hydrolyse de la fibrine par la papaine sans activateur et celles de la caséine avec activateur suivaient des lois semblables .

La méthode à la fibrine a l'avantage d'exprimer directement la quantité de matières protéiques hydrolysées .

Au contraire, les résultats des expériences effectuées avec la caséine seront chiffrés en millilitres de soude N/10, ce qui est une notation moins suggestive .

Comme, d'autre part, la loi d'action de masse n'est pas une loi linéaire, il est assez compliqué de faire correspondre des grammes de protéines aux millilitres de soude employés dans la formoltitration.

Aussi, préférons-nous recommander l'expression du titre d'une papaine par rapport à l'hydrolyse de la fibrine .

#### Définition d'un titre :

L'idée générale qui est à la base de toute définition du titre d'une papaine est la recherche de la quantité de substance albuminoïde hydrolysée par unité de poids de papaine.

On peut donc prendre comme valeur de titre d'une papaine l'extrait sec exprimé en milligrammes, correspondant aux produits d'hydrolyse de 2,500 grammes de fibrine sèche par un milligramme de papaine.

En revenant à nos précédentes notations, nous appellerons  $p_0$  l'extrait sec de 10 ml. de filtrat correspondant à l'hydrolyse de 2,500 g de fibrine par un milligramme de papaine.

Dans ces conditions, le titre exact est :

$$T_0 = p_0 \times 5 \times 4 \quad (3)$$

$P_0$  correspond à 10 ml. de filtrat prélevés sur 50 ml. d'hydrolysate ; c'est la raison pour laquelle nous le multiplions par 5 ; le facteur 4 est nécessaire si l'on veut se conformer à l'habitude, inscrite à la Pharmacopée Française, de rapporter les résultats obtenus avec de la fibrine sèche à de la fibrine fraîche.

$T_0$  est d'ailleurs la seule grandeur qui permette de caractériser vraiment une papaine .

En effet, si nous cherchons à définir un titre pour chaque concentration de papaine étudiée, nous obtiendrons des titres différents et d'autant plus faibles que la quantité de papaine mise en jeu sera plus élevée.

Ce titre ainsi calculé serait en effet de :

$$T = \frac{p \times 5 \times 4}{c}$$

soit, en remplaçant  $p$  par sa valeur selon l'équation (2) page 112 ,

$$\frac{p_o \times c^a \times 20}{c}$$

soit :

$$T = p_o \times c^{a-1} \times 20 \quad (4)$$

Ceci prouve que le calcul ainsi défini dépendrait de la concentration enzymatique et serait purement arbitraire .

D'ailleurs, la courbe des titres tracée pour la papaïne I.B.F. montre que la valeur du titre décroît quand la concentration  $c$  augmente. On obtient ainsi 4 titres différents pour 4 concentrations différentes de papaïne :

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| $c = 15 \text{ mg.}$  | $T = 291$  |
| $c = 60 \text{ mg.}$  | $T = 80,3$ |
| $c = 105 \text{ mg.}$ | $T = 56,7$ |
| $c = 150 \text{ mg.}$ | $T = 43$   |

Par contre, en caractérisant la papaïne par la grandeur  $T_o$  ,

$$T_o = p_o \times 20$$

nous avons une définition indépendante de la concentration enzymatique et la méthode préconisée est tout aussi accessible à l'expérience que les précédentes méthodes purement empiriques .

Il suffit en effet de déterminer des points expérimentaux de façon à pouvoir tracer avec assez de précision la droite caractéristique de la papaïne étudiée. De l'ordonnée à l'origine correspondante  $b$  , on tire le titre cherché :

$$b = \log . p_o$$

$$T_o = p_o \times 20$$

exemple : papaïne I.B.F. :

$$\begin{aligned} p_o &= 66 \\ T_o &= 66 \times 20 \\ \underline{T} &= \underline{1320} \end{aligned}$$

Le titre proposé pour la papaïne I.B.F. est de 1320 .

Nous tenons toutefois à faire remarquer que nous nous sommes placée dans des conditions telles que la fibrine soit en excès

par rapport au ferment.

Et notre loi en :  $\log. \frac{P}{P_0} = a \log. c$  a été établie dans ces conditions.

Ainsi la proportion de fibrine hydrolysée est-elle, dans ces conditions, relativement faible par rapport à la fibrine mise en jeu. Au maximum, nous pourrions avoir 1500 mg. d'extrait sec à partir de 2500<sup>mg</sup> de fibrine (pour une papaïne purissime). Compte- tenu de l'eau fixée au cours de l'hydrolyse, ceci ne représente qu'une hydrolyse de 50 % de la fibrine.

Etant donné que l'on opère toujours en présence d'un excès de fibrine, il n'est pas étonnant que l'équation de la réaction ne dépende pas de la concentration en fibrine, mais uniquement de celle de la papaïne, et nos résultats ne sont valables que dans ce cas.

FROSSARD rapporte à ce sujet des travaux de H. COLIN et Mademoiselle CHAUDON qui énoncent deux lois : (32)

« 1<sup>ère</sup> loi : - la diastase est en excès par rapport à la matière passive; la vitesse d'action est alors indépendante de la quantité du catalyseur » .

« 2<sup>ème</sup> loi : - la matière passive est en excès par rapport à la diastase; la vitesse d'action croît quand on augmente la quantité du catalyseur , .

Si on veut déterminer la quantité de papaïne nécessaire pour hydrolyser complètement la fibrine, dans ces conditions, le substrat et le ferment ne sont plus en excès ni l'un ni l'autre, et les lois antérieurement établies ne sont certainement plus valables. Et les extrapolations que l'on pourra faire n'auront qu'une valeur très incertaine.

Par exemple, dans l'essai effectué, nous obtenons les résultats suivants :

- théoriquement, selon la droite représentative de la papaïne I.B.F., un extrait sec non corrigé de 500 mg. devrait être obtenu par action de 280 mg. de papaïne I.B.F. agissant sur 2500 mg. de fibrine et les hydrolysant complètement;

- en fait, expérimentalement : 280 mg. de papaïne I.B.F. donnent, dans ces conditions, 422,8 mg. d'extrait sec non corrigé.

#### Méthode de dosage proposée :

- prendre 5 des tubes à pesée précédemment décrits ;
- peser à la balance de précision (à 1 mg. près) dans les tubes :
  - n° 1 : 0,015 g. de papaïne
  - n° 2 : 0,030 g. «    »

n° 3 : 0,050 g. de papaïne

n° 4 : 0,100 g. «    «

Le tube n° 5 servira à l'essai à blanc de la fibrine (voir plus loin)

- peser dans chaque tube 2,500 g. de fibrine desséchée (à 40° ou dans le vide) ;

- faire tomber les tubes et leur contenu dans des matras de Kjehldahl à bouchon émeri, ( cf. p. 72 ) numérotés ;

- verser 50 ml. d'eau épurée dans chaque matras ; ces 50 ml. seront mesurés à la pipette de précision ;

- agiter vigoureusement afin d'obtenir un mélange homogène ;

- introduire les matras dans un thermostat à circulation d'eau, réglé entre 70° et 75° ;

- déclencher un système d'agitation continue pendant cinq minutes, puis la minuterie qui permettra d'agiter périodiquement ( par exemple, deux minutes toutes les six minutes ) ;

- maintenir à 70° pendant deux heures ;

- plonger alors immédiatement les matras dans un bécher de deux litres contenant un mélange d'eau et de glace et agiter pendant deux minutes.

L'hydrolyse est ainsi arrêtée, la température intérieure des matras étant descendue à 10° ; (cf. p. 60 )

- filtrer sur entonnoir de Joulie muni d'un double filtre correspondant à la porosité n° 122 de Durieux ;

- recueillir les 15 premiers millilitres de chaque filtrat dans une éprouvette numérotée ;

- prélever 10 ml. de chacun de ces filtrats à l'aide d'une pipette de précision et en déterminer les extraits secs à 100° pendant trois heures ;

- faire un essai à blanc pour déterminer la quantité de fibrine solubilisée dans les conditions de l'expérience; ceci, en portant 2,500 g. de fibrine desséchée dans 50 ml. d'eau épurée pendant deux heures à 70° et en déterminant l'extrait sec du filtrat comme précédemment. (flacon n° 5) .

#### Calcul du titre :

- soit p le poids en milligramme de l'extrait sec de 10 ml. d'un filtrat résultant d'une hydrolyse papainique ;

- soit f le poids d'extrait sec en milligramme des produits

solubles issus de la fibrine et contenus dans 10 ml. de filtrat de l'essai à blanc ;

- soit  $c$  le poids en milligramme de papaïne employée ;
- l'extrait sec réel est :

$$e = p - f$$

- porter sur papier logarithmique les résultats d'extraits secs réels obtenus ; soit en abscisses les concentrations de papaïne, en ordonnées, les poids correspondants d'extraits secs réels ;

- tracer la droite qui joint, aux erreurs d'expérience près, les 4 points obtenus ; la pente de cette droite doit être voisine de  $1/3$  ;

- elle coupe l'axe des ordonnées en un point d'ordonnée  $\log.(p_0 - f)$  correspondant à  $c = 1$  ;

( $p_0 - f$ ) représente une partie aliquote du poids de fibrine protéolysé par milligramme de papaïne ;

- le titre de la papaïne est donc :

$$T_0 = (p_0 - f) \times 4 \times 5$$

- pour obtenir le poids de fibrine hydrolysé par un poids  $c$  de papaïne, on appliquera l'équation :

$$(p - f) = (p_0 - f) \times c^{1/3}$$

- nous préférons opérer ainsi avec quatre points qui nous permettent de tracer correctement une droite plutôt que d'opérer quatre fois avec la même concentration (15 mg. par exemple) et tracer ensuite une droite parallèle à celle obtenue avec une papaïne étalon par exemple.

En effet, ces quatre points sont choisis de façon à être régulièrement espacés sur le papier logarithmique. Normalement, ils doivent permettre de tracer une droite de pente voisine de  $1/3$ . S'il n'en était pas ainsi, c'est que l'hydrolyse aurait été mal conduite (déficience des produits ou erreur de l'opérateur).

Tandis que si l'on opère quatre fois avec la même concentration, on aura un point mieux défini mais on n'aura pas d'autre contrôle possible sur l'expérience, et une erreur systématique ne serait pas décelable.

#### QUELQUES TITRES DE PAPAINES ETUDIEES :

Le tableau qui suit indique les résultats obtenus avec diverses papaines en notre possession. Nous donnons les extraits secs réels, réduits, les valeurs de l'extrait sec à l'origine

( soit pour  $c = 1$  ), le titre selon le Codex actuel, le titre proposé .  
( Fig. XXXIV ).

Nous y joignons le graphique des droites représentatives des résultats obtenus selon ce nouveau système de dosage . ( fig. XXXV )

| PAPAINE       | c  | p     | p-s   | p <sub>0</sub> -s | Titre<br>Codex | Nouveau Titre<br>proposé |
|---------------|----|-------|-------|-------------------|----------------|--------------------------|
| I.B.F.        | 15 | 205,4 | 171,9 | 66                | 229,2          | 1320                     |
| B. hydros.    | 15 | 182,1 | 148,6 | 56                | 198,1          | 1120                     |
| B. lyophyl.   | 15 | 172   | 138,5 | 54                | 184,6          | 1080                     |
| Tanganika     | 15 | 170   | 136,5 | 52                | 182            | 1040                     |
| C. Bailly     | 15 | 167,0 | 133,5 | 50                | 178            | 1000                     |
| K.            | 15 | 165,4 | 131,9 | 49                | 175,8          | 980                      |
| Côte d'Ivoire | 15 | 160,4 | 126,9 | 47,5              | 169,2          | 950                      |

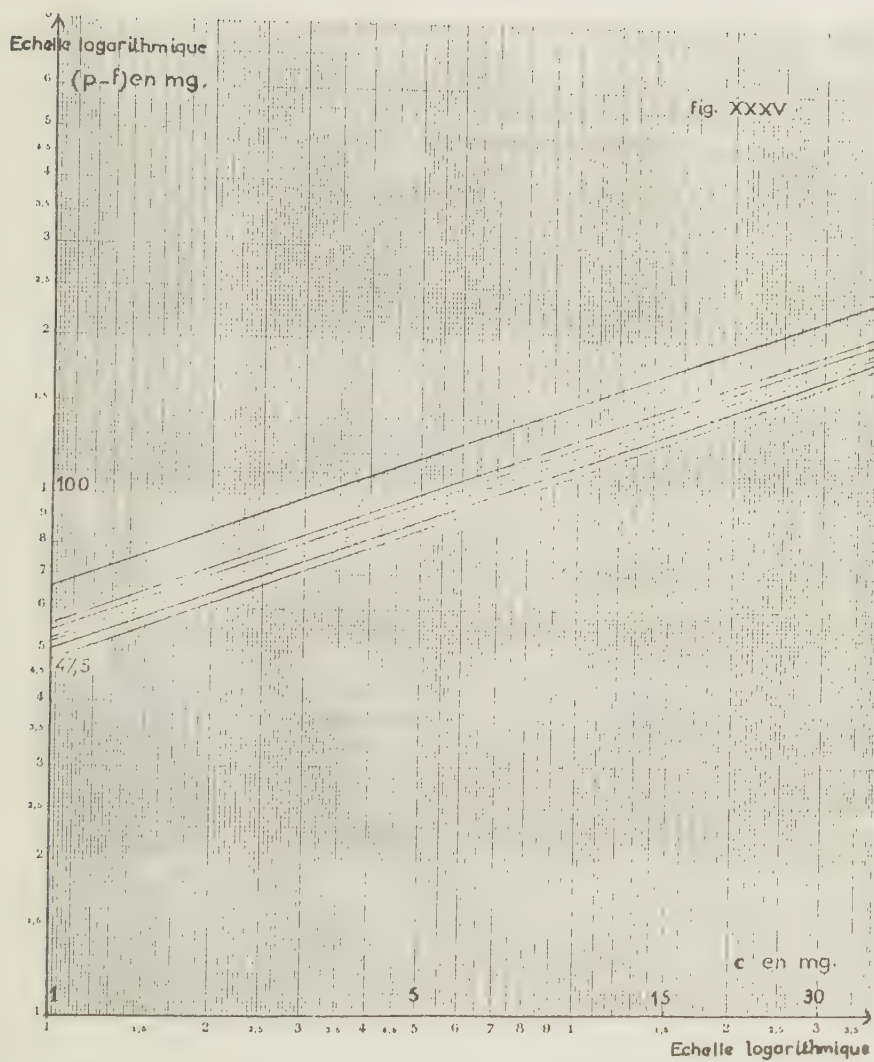
#### CLASSIFICATION PROPOSEE DES PAPAINES :

D'après nos expériences, on peut admettre la classification suivante :

- pourront porter le nom de papaine les papaines dont le titre  $T_0$  sera supérieur ou égal à 1000 unités précédemment définies .

- nous réserverons la dénomination de suc de papayer aux papaines dont le titre  $T_0$  sera inférieur à 1000 de ces unités . Ces substances ne pourront porter le nom de papaine qu'après purification et obtention d'un titre supérieur à 1000 unités .

÷  
÷      ÷  
÷



*CONCLUSION*

---

## CONCLUSION

---

*Devant la multiplicité des produits papainiques offerts sur le marché et l'incertitude des dosages effectués, nous avons été amenée à étudier diverses méthodes de dosage de la papaine .*

*Nous conseillons de conserver le principe de la méthode exposée au Codex français ( édition de 1949 ) , mais nous pensons qu'il serait préférable d'adopter une définition plus large du titre .*

*Nous avons mis au point un appareillage permettant d'effectuer plusieurs expériences simultanément et les conditions opératoires influant sur ce dosage ont été minutieusement étudiées et précisées .*

*En respectant scrupuleusement les conclusions auxquelles nous sommes arrivée, tant au point de vue matériel à utiliser que précautions à prendre, nous obtenons un dosage facilement reproductible .*

*Les résultats de l'hydrolyse se traduisent sur papier logarithmique par une droite qui permet une détermination facile, pratique et rapide du titre d'une papaine.*

*Nous avons été conduite, d'autre part, à préciser la notion du titre d'une papaine indépendamment de la concentration de celle-ci dans l'expérience, rejoignant ainsi la définition générale et beaucoup plus large du titre d'une enzyme .*

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- 1 - AMMON (R.) : *Pharmazie* - 1950 - 57 , 1950 - 77 ..
- 2 - ANSON : *J. Gen. Physiology* - 1937 - 20 - p. 561 .
- 3 - ARNOLD AARON , SCHMITZ (J.R.) , BLUMBERG (H.) : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - 54 - p. 273 ..
- 4 - BABIN (R.M.) : *Thèse Doct. Pharm. (Etat)* - Bordeaux - - 1953 ..
- 5 - BABIN (R.M.) , RIGAUD (A.) , BRISCU (J.) : *C.R. Soc. fr. Microbiologie* - 1949 - 143 - p. 399-400 ..
- 6 - BALLS (A.K.) , HOOVER (S.R.) : *J. biol. Chem.* - 1937 - 121 - p. 737 ..
- 7 - BALLS (A.K.) , LINEWEAVER (H.) , THOMPSON (R.R.) : *J. biol. Chem.* - 1939 - 130 - p. 669
- 8 - BAMANN , MYRBÄCK : *Methoden der Fermentforschung* - Tübingen Stockolm - 1940 ..
- 9 - BEHRENS , BERGMANN (M.) : *J. biol. Chem.* - 1939 - 129 - p. 587 ..
- 10 - BERGMANN (M.) , ZERVAS (L.) , FRUTON (J.S.) : *J. biol. Chem.* - 1935 - 115 - p. 593 , 1937 - 119 - p. 35 , 1937 - 127 - p. 643 ..
- 11 - BERSIN (T.) , LOGEMANN : *Z. physiol. Chem.* - 1933 - 222 - p. 177 , *Biochem Z.* - 1935 - 278 - p. 340 , *Ergebn. Enzymforsch.* - 1935 - 4 - p. 63 ..
- 12 - BERSIN (T.) , LOGEMANN : *Z. physiol. Chem.* : 1933 - 220 - p. 209 ..
- 13 - BLACKBURN : *Biochem. J.* - 1950 - 47 - p. 443 .
- 14 - BOUCHUT : *Sur le traitement des toénias par les vermivores* .. Paris Med. 1880 , in *J. Sc. Med.* , Lille - 1881 ..

- 15 - BRAND , KASSEL : *J.biol. Chem.* - 1938 - 125 - p. 435.
- 16 - *BRITISH PHARMACEUTICAL CODEX* : Editions de 1934 , 1949 , 1954 .
- 17 - BULLOCK (K.) et SEN (J.K.) : *J.of Pharm. Pharmacol.* - 1950.2 - p. 693 , 1951 , 3 - p. 476-485 .
- 18 - CARLE (J.) : *France Pharmacie* - 1953 . p. 7.
- 19 - CARROZ (M.) : Essais d'homogénéisation des crachats de tuberculeux par la papaine - Lyon - 1947 .
- 20 - CLOSE (J.) : *Thèse de Doctorat de la Faculté des Sciences Université de Liège* , 1951 .
- 21 - CLOSE (J.) , MOORE (S.) , BIGWOOD (E.J.) : *Enzymologia* - 1953 - 16 - p. 13 .
- 22 - *CODEx MEDICAMENTARIUS GALLICUS* : VII<sup>ème</sup> édition - 1949 .
- 23 - COSTE : *Presse med.* - 1953 - 58 - p. 469 .
- 24 - COURTOIS (J.) , FLEURY (P.) - Les diastases . Colin éd. Paris - 1948 .
- 25 - DELAUNAY (A.) , BAZIN (S.) : *Revue française de Gériatologie* - août 1960 - p. 301-309 .
- 26 - DELEZENNE (C.) , MOUTON (H.) , POZERSKI (E.) : *C R.Soc. Biol.* - 1906 - LX - 68 - 309 .
- 27 - DELMOTTE -PLAQUEE (J.) : *Journal de Pharmacie de Belgique* - 1958 - 13 (7-8) - p. 227-242 .
- 28 - DESCOURTILZ (M.E.) : *Flore pittoresque et médicale des Antilles* - Paris - Pichard - 1821-29 - 8 vol. -
- 29 - EAGLE (H.) , HARRIS (T.) : *J.gen.Physiolog.* - 1937 - 20 - 543 .
- 30 - EFFRONT (J.) : *Les catalyseurs biochimiques dans la vie et dans l'industrie* . Paris - 1914 - H.Dunod éd.

- 31 - FINKLE (J.R.) , SMITH (E.L.) : *J. biol. Chem.* - 1939 - 130 - 375 .
- 32 - FROSSARD (R.) : *La papaïne et sa protéolyse - Lons-le-Saulnier - 1926 (Thèse Université Paris)* .
- 33 - FRUTON (J.S.) , LAVIN : *J. biol. Chem.* - 1937 - 130 - p. 375 .
- 34 - GAUTHIER (B.) , CAPPELAERE (G.) , GECFFROY : *Ann. pharm. fr.* - 1957 - XV - p. 31 .
- 35 - GORIS (A.) , LIOT (A.) , JANOT (M.M.) , GORIS (A.) : *Pharmacie Galénique - Masson, Paris-1949* .
- 36 - GRABER (H.T.) : *J. Ind. Eng. Chem.* - 1911 - 3 - p. 919 .
- 37 - GRASMAN (W.) : *Z. physiol. Chem.* : 1930 - 194 - p. 124 , 1939 - 183 - p. 32 .
- 38 - HATA TADAO , SEISUO NATSHIITA : *Mem. Research Inst. Food Soc. (Kyoto Univ.)* - 1955 - 9 - p. 19 et p. 30
- 39 - HINKEL (E.T.) : *Annals of New-York Academy of science* - 1951 - 54 - p. 245 .
- 40 - HINKEL (E.T.) , AARON ARNOLD : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - 54 - p. 277 .
- 41 - HINKEL (E.T.) , ZIPPIN (C.) : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - 54 - p. 228 .
- 42 - HIRSHLER : *Ungar. Arch. f. Med. (Wiesb.)* - 1892 - 1 - p. 341 .
- 43 - HOOVER (S.R.) , KOKES (E.) : *J. biol. Chem.* - 1947 - 167 - p. 199 .
- 44 - HWANG (K.) , IVY (A.C.) : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - 54 - p. 208 .
- 45 - *INDEX KERWENSIS PLANTARIUM PHANEROGAMARUM* : Oxonii - 1886 - 1940 (5 volumes + 10 suppléments) .
- 46 - IRVING (G.W.) , FRUTON (J.S.) , BERGMANN (M.) : *Gen. Physiol.* 1942 - 28 - p. 669 .

- 47 - JACOBY : *Biochem. Zeit.* - 1926 - 175 - p. 79.
- 48 - JANSEN (E.F.) , BALLS (A.K.) : *J.biol.Chem.* - 1941 - 137 - p. 459 .
- 49 - KASSEL , BRAND : *J.biol.Chem.* : 1938 - 125 - p. 435 .
- 50 - KILMER (J.B.) : *Am. Journal of pharmacy* - 1901 - 73 - p. 273 .
- 51 - KIMMEL (J.R.) , SMITH (E.L.) , THOMSON : *J.biol.Chem.* - 1939 - 130 - p.669 .
- 52 - KREBS (H.A.) : *Biochem. Zeit.* - 1939 - 220 - p. 289 ,  
*Naturwissenschaften* - 1931 - 19 - p. 133 .
- 53 - LAGER (R.K.) : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - (54) - p. 236 .
- 54 - LE POLLES (C.Y.) , HOLTZHAUER (Y.) : *Bulletin de la Société de Pharmacie de l'Ouest* : 1960 - n°4 - p. 80-83 .
- 55 - MASCHMANN : *Z.physiol.Chem.* - 1934 - 224 - p. 56 .
- 56 - MASCHMANN , HELLMERT : *Z.physiol.Chem.* - 1934 - 223 - p. 127 ,  
1934 - 228 - p. 141 .
- 57 - MENDEL (L.B.) , BLOOD (L.F.) : *J.biol.Chem.* - 1910 - 8 - p. 177 .
- 58 - MESNARD , BABIN (R.M.) : *Bull.Soc. de Pharmacie de Bordeaux* - 1953 - 98-94 - 214 .
- 59 - MEYER (K.) , HALNEL (E.) , STEINBERG (A.) : *J.biol.Chem.* - 1946 - 163 - p. 733 .
- 60 - MURRAY (D.R.P.) : *Biochem.J.* - 1933 - 27 - p.543 .
- 61 - NATIONAL FORMULARY : 8<sup>ème</sup> édition - U.S.A. .
- 62 - ONCLEY : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - 54 - p. 121 .
- 63 - PURR (A.) , RUSSEL (M.) : *Z.physiol.Chem.* - 1934 - 228 - p.198 .
- 64 - RAMON (G.) : *Presse méd.* - 1944 - 52 - p. 249 .

- 65 - ROBBINS , LANSON , BERGER , ASENJON : 1934 , cité dans Cris-  
talline enzyms : Northrop , Kunitz , Herriot .
- 66 - RUBINSTEIN : *Nature* - 1957 - 180 - p. 1.202 .
- 67 - SCOTT (E.M.) , SANDSTRÖM (W.M.) : *Arch. Biochem* - 1942 - 1 -  
p. 103 .
- 68 - SMITH , KIMMEL , BROWN : *J.biol.Chem.* - 1954 - 207 - p. 515
- 69 - SMITH , STOCKELL , KIMMEL : *J.biol.Chem.* - 1954 - 207 - p. 533 .
- 70 - SINHA RAMESH CHANDRA : *Enzymologia* - Pays-Bas - 1957 - 18 -  
5 - p. 288 , 1958 - 19 - 5 - p. 319 .
- 71 - SUMNER (J.B.) , MYRBÄCK : Chemistry and Mecanism of action of  
Enzyms - Academic Press Publishers - New-York - 1930 - 1952 .
- 72 - SUMNER (J.B.) , ZERVAS , FRUTON , KIRK (J.S.) , KOWELL (S.F.) :  
*J.biol.Chem* - 1932 - 98 - p. 543 .
- 73 - SUTERMEISTER , BROWNE : Casein and its industrial applications -  
Reinhold publishing corporation - American Chemical Society -  
1939 - n° 30 .
- 74 - TAINTER , BUCHANAN : *Annals of New-York Academy of Science* -  
1951 - 54 - p. 147 .
- 75 - TAYEAU (F.) , BUFFE (M.) : *C.R.Soc.Biol.* - 1946 - 140 - p. 508 -
- 76 - THOMAS LEWISS : *J.exp.Med.G.* - 1956 - 204 - p. 245 .
- 77 - THOMPSON (R.F.) : *J. biol. Chem.* - 1954 - 207 - p. 563 .
- 78 - VAUQUELIN : *Ann.Chimie* - 1802 - XVIII - p. 267 .
- 79 - VILLIERS-HUIBAN : *Thèse Pharmacie* - Paris - 1958 .
- 80 - VINES (S.H.) : *Ann. Botany* - 1901 - 15 - p. 570 , 1905 - 19 - p. 149 .
- 81 - WALDSCHMITZ-LEITZ , CONRATZ , GLOEDITSCH : *Naturwissen-*  
*schaften* - 1931 - 25 - p. 60 .

- 82 - WILLSTAETTER (R.) , GRASSMANN (W.) : *Zeit. physiol. Chem.* - 1924 - 138 - p. 184 , 1925 - 151 - p. 286 .
- 83 - WIZAN (H.) , SHEPPHERD (J.R.) , AARON ARNOLD : *Annals of New-York Academy of Science* - 1951 - 54 - p. 282 .
- 84 - WÜRTZ (A.) , BOUCHUT (E.) : *Recherches chimiques et cliniques sur la papaïne ou pepsine végétale extraite du Carica papaya* Paris , Baillière , 1879 .
-





